

BOX PATENT
Attorney Docket No. 24170
IN THE UNITED STATES PATENT AND TRADEMARK OFFICE

In re Application of:

Jongbae KIM	Jinhwan KWAK
Seongkyu SONG	Byeoungdoo SONG
Byungsun SUH	Taekjoon YOON
Kwanee LEE	Taebong KANG
Myoungsool DOO	Choonho PARK

Group Art Unit: 1614

RECEIVED
NOV 07 2000
TECH CENTER 1600/2900

Serial No. 09/627,165

Filed: July 27, 2000

For: **CRUDE EXTRACT FROM *Viscum album coloratum*, AND PROTEINS AND LECTINS ISOLATED THEREFROM**

TRANSMITTAL LETTER

Assistant Commissioner for Patents
Washington, D.C. 20231

RECEIVED

Sir:

JAN 24 2001

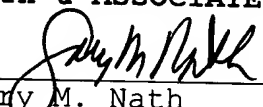
Submitted herewith for filing in the U.S. Patent and Trademark Office is the following:

TECH CENTER 1600/2900

- (1) Transmittal Letter
- (2) Request for Priority
- (3) Priority document No. 99-30638

Respectfully submitted,
NATH & ASSOCIATES PLLC

By: _____


Gary M. Nath
Registration No. 26,965
Customer No. 20529

Date: November 3, 2000
NATH & ASSOCIATES
1030 15th Street N.W., 6th Floor
Washington, D.C. 20005
(202) 775-8383
GMN/dd:Priority.TRANS



[Handwritten signature]

IN THE UNITED STATES PATENT AND TRADEMARK OFFICE

BOX PATENT
Attorney Docket No. 24170

In re Application of:

Jongbae KIM	Jinhwan KWAK
Seongkyu SONG	Byeoungdoo SONG
Byungsun SUH	Taekjoon YOON
Kwanee LEE	Taebong KANG
Myoungsool DOO	Choonho PARK

Group Art Unit: 1614

(1600)

RECEIVED

NOV 07 2000

TECH CENTER 1600/2900

Serial No. 09/627,165

Filed: July 27, 2000

For: **CRUDE EXTRACT FROM *Viscum album coloratum*, AND PROTEINS AND LECTINS ISOLATED THEREFROM**

REQUEST FOR PRIORITY UNDER 35 U.S.C. §119

BOX PATENT APPLICATION

Assistant Commissioner for Patents
Washington, D.C. 20231

RECEIVED

JAN 24 2001

TECH CENTER 1600/2900

Sir:

In the matter of the above-captioned application, notice is hereby given that the Applicant claims as priority date July 27, 1999, the filing date of the corresponding application filed in KOREA bearing Application Number 99-30638.

A Certified Copy of the corresponding application is submitted herewith.

Respectfully submitted,

NATH & ASSOCIATES PLLC

Date: November 3, 2000

By: *Gary M. Nath*
Gary M. Nath
Reg. No. 26,965
Customer No. 20529

NATH & ASSOCIATES PLLC
6TH Floor
1030 15TH Street, N.W.
Washington, D.C. 20005
(202)-775-8383
GMN/dd (Priority)

RECEIVED

NOV 07 2000

TECH CENTER 1600/2900

09/627165

대한민국 특허청

KOREAN INDUSTRIAL PROPERTY OFFICE



별첨 사본은 아래 출원의 원본과 동일함을 증명함.

This is to certify that the following application annexed hereto
is a true copy from the records of the Korean Industrial
Property Office.

출원번호 : 특허출원 1999년 제 30638 호
Application Number

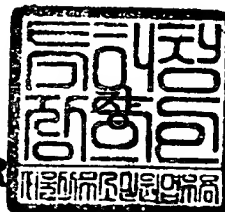
출원년월일 : 1999년 07월 27일
Date of Application

출원인 : 주식회사 미슬바이오텍
Applicant(s)

2000 년 10 월 23 일

특 허 청

COMMISSIONER



출력 일자: 2000/10/25

【서류명】	출원인명의변경신고서
【수신처】	특허청장
【제출일자】	2000.07.25
【구명의인】	
【성명】	김종배
【출원인코드】	419980175438
【신명의인】	
【성명】	주식회사 미슬바이오텍
【출원인코드】	120000348997
【대리인】	
【성명】	이덕록
【대리인코드】	919980004617
【포괄위임등록번호】	19990459363
【포괄위임등록번호】	20000419688
【사건의 표시】	
【출원번호】	1019990030638
【출원일자】	1999.07.27
【심사청구일자】	2000.02.25
【발명(고안)의 명칭】	한국산 겨우살이 추출물과 이로부터 분리한 단백질 및 상 기 단백질에서 분리한 펩틴
【변경원인】	전부양도
【취지】	특허법 제38조제4항·실용신안법 제20조·의장법 제24조 및 상표법 제12조제1항의 규정에 의하여 위와 같이 신고합니다
【수수료】	13000
【첨부서류】	양도증 1통 인감증명서 1통

【서류명】	특허출원서
【권리구분】	특허
【수신처】	특허청장
【제출일자】	1999.07.27
【발명의 명칭】	한국산 겨우살이 추출물과 이로부터 분리한 단백질 및 상 기 단백질에서 분리한 렉틴
【발명의 영문명칭】	Crude extract from Viscum album coloratum, protein and lec tins isolated therefrom
【출원인】	
【성명】	김종배
【출원인코드】	4-1998-017543-8
【대리인】	
【성명】	이덕록
【대리인코드】	9-1998-000461-7
【포괄위임등록번호】	1999-045936-3
【발명자】	
【성명】	김종배
【출원인코드】	4-1998-017543-8
【발명자】	
【성명의 국문표기】	송성규
【성명의 영문표기】	SONG, Seong Kyu
【주민등록번호】	541023-1247717
【우편번호】	791-260
【주소】	경상북도 포항시 북구 장성동 선우비치 1107호
【국적】	KR
【발명자】	
【성명의 국문표기】	서병선
【성명의 영문표기】	SUH, Byung Sun
【주민등록번호】	540518-1037511
【우편번호】	791-260
【주소】	경상북도 포항시 북구 장성동 선우비치 1204호
【국적】	KR

【발명자】

【성명의 국문표기】

이관희

【성명의 영문표기】

LEE,Kwan Hee

【주민등록번호】

610406-1025919

【우편번호】

791-220

【주소】

경상북도 포항시 북구 우현동 청구아파트 101동 107호

【국적】

KR

【발명자】

【성명의 국문표기】

도명술

【성명의 영문표기】

DOO,Myoung Sool

【주민등록번호】

580129-1000218

【우편번호】

791-250

【주소】

경상북도 포항시 북구 창포동 645번지 창포주공아파트 10동 702호

【국적】

KR

【발명자】

【성명의 국문표기】

곽진한

【성명의 영문표기】

KWAK,Jin Hwan

【주민등록번호】

610206-1696016

【우편번호】

791-220

【주소】

경상북도 포항시 북구 우현동 134번지 한신아파트 1008호

【국적】

KR

【발명자】

【성명의 국문표기】

송병두

【성명의 영문표기】

SONG,Byeoung Doo

【주민등록번호】

590216-1319123

【우편번호】

791-110

【주소】

경상북도 포항시 북구 두호동 산호그린아파트 6동 406호

【국적】

KR

【발명자】

【성명의 국문표기】

윤택준

【성명의 영문표기】

YOUN,Taek Joon

【주민등록번호】

630228-1041622

【우편번호】 411-570
【주소】 경기도 고양시 일산구 성석동 1043-3
【국적】 KR
【발명자】
【성명의 국문표기】 강태봉
【성명의 영문표기】 KANG,Tae Bong
【주민등록번호】 680229-1775037
【우편번호】 791-940
【주소】 경상북도 포항시 북구 흥해읍 중성리 133 상용빌라 3차 404호
【국적】 KR
【발명자】
【성명의 국문표기】 박춘호
【성명의 영문표기】 PARK,Choon Ho
【주민등록번호】 701026-1108515
【우편번호】 791-940
【주소】 경상북도 포항시 북구 흥해읍 남송리 3번지 한동대주택 B동 1호
【국적】 KR
【핵산염기 및 아미노산 서열목록】
【서열개수】 002
【서열목록의 전자문서】 첨부
【취지】 특허법 제42조의 규정에 의하여 위와 같이 출원합니다. 대리인 이덕록 (인)
【수수료】
【기본출원료】 20 면 29,000 원
【가산출원료】 95 면 95,000 원
【우선권주장료】 0 건 0 원
【심사청구료】 0 항 0 원
【합계】 124,000 원
【감면사유】 개인
【감면후 수수료】 62,000 원
【첨부서류】 1. 요약서·명세서(도면)_1통

【요약서】

【요약】

본 발명은 한국산 겨우살이(*Viscum album coloratum*)로부터 면역증강 및 항종양전이 활성이 있는 추출물, 상기 추출물에 함유된 단백질 및 상기 단백질에서 분리한 렉틴성분의 면역증강제 및 항종양제로서의 용도에 관한 것으로 한국산 겨우살이 추출물 KM-110과 상기 추출물로부터 분리한 단백질 KM-AS, 렉틴성분 KML-C, 상기 렉틴성분에서 분리한 두 종류의 렉틴 KML-IIU과 KML-IIL, 단백질 KM-AS에서 KML-C를 제거한 C-free-AS를 헤파린 컬럼에 통과시켜 분리한 단백질 KMHP 및 단백질 KMHP와 렉틴성분 KML-C의 혼합물 KM은 단백질 항원에 대한 체액성 및 세포성 면역체계를 자극하는 면역증강 효과가 있으며, 동물에 대한 임상 실험결과 종양세포에 대해 직간접적으로 대응하는 대식세포 및 자연살해세포의 활성 및 종양에 대한 세균독성 T세포(CTC)의 활성을 높이는 등 항종양효과를 나타내는 뛰어난 효과가 있다.

【대표도】

도 1

【색인어】

Viscum album coloratum, lectin, immuno-enhancement

【명세서】**【발명의 명칭】**

한국산 겨우살이 추출물과 이로부터 분리한 단백질 및 상기 단백질에서 분리한 렉틴
{Crude extract from *Viscum album coloratum*, protein and lectins isolated therefrom}

【도면의 간단한 설명】

도 1은 가수분해시킨 세파로스-4B컬럼에 의해 한국산 겨우살이 추출물 유래의 단백질 KM-AS로부터 렉틴성분 KML-C를 분리하는 크로마토그래피 결과와 전기영동 결과를 나타낸다.

도 2는 본 발명 추출물 KM-110과 단백질 KM-AS간의 B16-BL6, Raji, 정상적인 림프구에 대한 세포독성 결과를 나타낸다.

도 3은 본 발명 추출물 KM-110의 투여로 인한 면역담당세포들의 유사분열물질인 Con.A 및 LPS에 대한 반응성 결과를 나타낸다.

도 4는 렉틴성분 KML-C의 투여로 인한 면역담당세포들의 유사분열물질인 Con.A에 대한 반응성을 나타낸 그래프이다.

도 5는 본 발명 추출물 KM-110, 단백질 KM-AS의 IL-1 유도 결과를 나타낸다.

도 6은 단백질 KM-AS에서 분리한 렉틴성분 KML-C의 IL-1 유도활성 결과를 나타낸다.

도 7은 각 시험물질로 자극한 대식세포 배양상등액에서 IL-1의 유도분비 결과를 나타낸다.

도 8은 대식세포 배양상등액을 이용한 본 발명 추출물 KM-110과 KML-C 및 유럽산 렉틴

성분 EML-1, 그리고 본 발명 렉틴성분 KML-C가 제거된 단백질 분획 C free-AS에 의한 TNF- α 와 IL-6 및 IFN- γ 의 분비 유도 결과를 나타낸다.

도 9는 IFN- γ 유도인자를 분리하기 위해 염화나트륨 농도에 따른 용출분획의 크로마토그램한 결과를 나타낸다.

도 10은 염화나트륨 농도에 따른 용출분획이 IFN- γ 를 유도한 활성 결과를 나타낸다.

도 11은 본 발명 추출물 KM-110의 투여일수와 농도에 따른 NK-세포의 활성 변화를 나타낸다.

도 12는 YAC-1 증식억제효과로 렉틴성분 KML-C의 NK-세포에 미치는 활성을 나타낸 그래프이다.

도 13은 본 발명 추출물 KM-110을 정맥, 피하, 경구, 경비주사로 종양접종 2일 전에 Balb/c 및 C57BL/6 마우스에 투여한 후 종양 전이 효과를 조사한 결과를 나타낸다.

도 14는 본 발명 렉틴성분 KML-C의 결장 26-M3.1 세포에 의해 생성된 폐암전이에 대한 종양전이 억제능의 결과를 나타낸다.

도 15는 본 발명 추출물 KM-110을 투여한 마우스의 대식세포가 B16-BL6 흑색종에 대한 살해능의 결과를 나타낸다.

도 16은 anti-asialo-GM1항체를 미리 주사하여 NK-세포가 제거된 마우스를 이용해 결장 26-M3.1 폐암 전이에 미치는 본 발명 추출물 KM-110의 효과를 나타낸다.

도 17은 생체내 종양의존성 혈관신생과 종양생장에 대한 본 발명 추출물 KM-110의 저해 효과를 나타낸다.

도 18은 KLH의 항체생성에 대한 본 발명 추출물 KM-110과 렉틴성분 KML-C의 효과를 나타낸다.

도 19는 본 발명 추출물 KM-110을 섞은 것과 안 섞은 KLH를 갖고 면역법에 의해 증가된 KLH-특이항체의 서브이소타입의 분석결과를 나타낸다.

도 20은 KLH로 면역처리한 비장세포의 항원특이 분화활성 결과를 나타낸다.

도 21은 KLH에 감작된 마우스 비장세포로부터 IL-2와 IL-4의 유도여부를 나타낸다.

도 22는 본 발명 추출물 KM-110과 렉틴성분 KML-C를 항원 KLH로 면역시킨 마우스가 항원 단독 면역처리된 마우스에 비해 콧패드 중기가 증가된 것을 나타낸다.

도 23은 이중종양세포에 대해서 본 발명 추출물 KM-110에 의한 CTL활성증가 효과 결과를 나타낸다.

도 24는 종양백신과 본 발명 추출물 KM-110을 단독 또는 동시 투여한 후, 비장세포의 특이적 분화 결과를 나타낸다.

도 25는 본 발명 렉틴성분 KML-C와 유럽산 렉틴성분 EML-1에 대한 항체 9H7-D10과 8B11-2C5의 교차반응 결과를 나타낸다.

도 26은 면역친화성크로마토그래피를 사용하여 본 발명 렉틴성분 KML-C로부터 렉틴들 KML-IIU 및 KML-II C를 분리한 것을 나타낸다.

도 27은 본 발명 렉틴 KML-IIU 및 KML-II L, 그리고 유럽산 렉틴성분 EML-1에 대하여 높은 반응성을 나타낸 9H7-D10과 8B11-2C5항체를 이용하여 각 렉틴과 단일클론항체의 교차반응 결과를 나타낸다.

도 28은 9H7-D10과 8B11-2C5의 단일클론항체에 의한 각 렉틴성분의 세포독성 증화효과를 나타낸다.

도 29는 본 발명 렉틴성분 KML-C로부터 분리된 렉틴들 KML-IIU와 KML-IIL의 사이토카인 유도능을 유럽산 렉틴성분 EML-1의 유도능과 비교한 것이다.

도 30은 세포독성과 사이토카인의 유도활성에 근거하여 렉틴간의 생체내 종양전이 억제 활성을 나타낸 것이다.

도 31은 본 발명 추출물 KM-110과 본 발명 렉틴물질 KML-IIU 및 KML-IIL의 HBV에 대한 항체 생산능을 비교한 것이다.

도 32는 렉틴유전자를 클로닝하여 재조합한 플라스미드 벡터의 모식도이다.

도 33는 본 발명 렉틴물질 KML-IIU의 유전자 및 아미노산 염기서열을 나타낸다.

도 34는 본 발명 렉틴물질 KML-IIL의 유전자 및 아미노산 염기서열을 나타낸다.

도 35는 본 발명 추출물 KM-110을 함유하는 복합보조액의 마이코프라즈마 항원에 대한 항체 생산능에 있어서 시너지 활성 유도를 비교한 그래프이다.

도 36은 Sandwich ELISA에 의한 본 발명 렉틴성분 KML-C와 렉틴물질 KML-IIU의 표준곡선을 작성하여 검출범위를 나타낸다.

【발명의 상세한 설명】

【발명의 목적】

【발명이 속하는 기술분야 및 그 분야의 종래기술】

<37> 본 발명은 한국산 겨우살이(*Viscum album coloratum*)로부터 추출한 추출물과 이로부터

분리한 단백질 및 렉틴 물질들에 관한 것이다. 더욱 상세하게는, 본 발명은 한국산 겨우살이로부터 생체면역을 증강시키고 항종양전이활성을 나타내며 세포면역능을 유도하는 백신에 대한 보조액으로 응용할 수 있는 추출물과 이 추출물에 함유된 단백질 및 상기 단백질로부터 분리한 렉틴들에 관한 것이다.

<38> 겨우살이(mistletoe, *Viscum album*)는 여러 종류의 나무를 숙주로 하여 성장하는 반기생식물로서 세계 전역에는 30속 1,500종의 식물이 있는 것으로 알려져 있다. 여러 종류의 겨우살이 중에 현재 약재로 사용되고 있는 것은 *Viscum*속(genus)의 겨우살이로서, 주로 유럽지역에서 서식되는 *Viscum album loranthacea*이다. 유럽의 *loranthacea*과에 속하는 겨우살이는 오래 전부터 민간요법에서 고혈압, 동맥경화증, 암 등에 대하여 효과가 있는 신비의 약재로 사용하다가 1921년부터 항암 활성을 인정받아 종양에 대한 치료 및 그 보조액으로 사용하고 있다. 따라서, 겨우살이의 생물학적 활성에 대한 연구는 주로 유럽지역에 서식하는 겨우살이에 대하여 수행되어 왔다. 유럽지역에 서식하는 겨우살이는 체액성 및 세포성 면역체계를 자극하는 면역증강 효과가 있는 것으로 보고되어 왔고, 동물 및 인간에 대한 임상 실험결과 종양세포에 대하여 직접 또는 간접적으로 대응하는 대식세포 및 자연살해세포의 활성을 증가시킴으로서 종양세포의 성장을 억제하고, 암 환자의 생존율을 증진시키는 효과가 있는 것으로 보고되었다. 이러한 효과는 겨우살이의 면역증강 작용 및 종양세포에 대한 직접적인 세포독성 효과가 관여하는 것으로 알려져 있으며, 대표적인 활성물질로는 렉틴성분들로서 당쇄 부분의 특이성 및 분자량에 따라 렉틴 I, II, III의 3종류로 구별하고 있으며 주로 렉틴 I에 대한 면역학적, 생화학적 연구가 진행되고 있다.

<39> 한편, 유럽산 겨우살이와 구별되는 한국산 겨우살이(

Viscum album coloratum) 역시 민간 및 한방에서 요통, 고혈압, 유산방지, 치통에 대한 약제로 사용하여 왔으며, 한방에서는 숙주나무에 따라 상기생, 기생목, 해기생 등의 각기 다른 이름으로 불려지고 있는 것으로 보아, 숙주나무에 따른 상이한 약효 및 그에 기인되는 성분상의 차이가 있음을 암시하고 있다. 실제로 유럽산 겨우살이는 숙주에 따른 렉틴(lectin)성분 등의 차이가 보고된 바 있어, 한국산 겨우살이에서 숙주 등에 따른 성분의 변화가 있을 수 있다는 가능성을 배제할 수가 없다. 이러한 사실로서 한국산 겨우살이에 대한 과학적인 연구로서의 최초 논문에서 Khwaja 등은 한국산 겨우살이의 항종양 효과 및 활성성분에 대하여 보고하였다. 이들에 의하면 한국산 겨우살이의 항종양 효과는 유럽산의 경우와는 다르게 렉틴(lectin)에 의한 것이 아니라, 강한 독성의 알칼로이드(alkaloids)에 의한 세포독성효과에 의해 기인하는 것으로 보고하여 유럽산 겨우살이와 한국산 겨우살이의 항종양 활성 성분 및 기작을 구별하였으나, 그 이후의 자세한 연구결과는 보고된 바 없다. 그러나, 최근 본 발명자들의 연구 결과에 따르면, 한국산 겨우살이 역시 대식세포(macrophage)를 직접 활성화 시켜서 인터루킨-1(Interleukin-1, 이하 IL-1)과 종양 괴사 인자(Tumor necrosis factor- α , 이하 TNF- α)를 유도하며, 이들 사이토카인(cytokine)들을 유도하는 활성 성분은 암모니움 설페이트(ammonium sulphate)에 의해 침전되는 단백질 성분인 것을 규명하고 한국산 겨우살이 추출물로부터 두 종류의 렉틴(lectin)들을 분리하였다.

<40> 따라서, 본 발명의 목적은 한국산 겨우살이로부터 생체면역을 증강시키고 항종양전이활성을 나타내며 세포면역능을 유도하는 백신에 대한 보조액으로 응용할 수 있는 추출물과 이 추출물에 함유된 단백질 및 상기 단백질로부터 분리한 렉틴들을 제공함에 있다. 본

발명의 다른 목적은 상기 렉틴들의 유전자 염기서열을 제공함에 있다.

【발명이 이루고자 하는 기술적 과제】

<41> 본 발명의 상기 목적은 한국산 겨우살이로부터 증류수를 이용하여 추출물 KM-110을 추출하고 추출한 추출물로부터 암모니아 설페이트 용액을 이용한 침전법으로 단백질 분획 KM-AS을 분리한 후 이로부터 크로마토그래피법을 이용하여 렉틴성분 KML-C을 분리한 다음, 한국산 겨우살이 추출물 KM-110과 렉틴성분 KML-C의 면역자극, 항원 특이적인 면역 증강 및 항종양 활성을 조사한 후, 추출물 KM-110으로부터 분리한 단백질 분획중 렉틴성분을 제외한 단백질 성분으로 IFN- γ 를 유도하는 단백질 성분(Korean mistletoe heparin binding protein;KMHP)을 헤파린 컬럼(heparin column)을 이용하여 분리하고, 상기 렉틴성분에 대한 단일클론 항체를 생산하여 항체의 특성을 조사하고 유럽산 렉틴성분과 교차반응을 나타내지 않는 항체를 이용하여 렉틴성분으로부터 두 종류의 렉틴 KML-IIU 및 KML-IIL을 분리한 다음, 이 두 종류의 렉틴을 전기영동 및 유전자 클로닝을 포함하는 아미노산 서열을 조사하여 한국산과 유럽산 렉틴 성분간의 명백한 차이점을 확인하였다. 이어서, 추출물 KM-110에서 렉틴성분 KML-C을 제외한 단백질성분을 헤파린 컬럼에 통과시켜 분리한 단백질 KMHP과 렉틴성분 KML-C를 혼합한 혼합물 KM의 면역자극효과, 세포독성 및 종양전이억제효과를 조사하므로써 달성하였다.

<42> 이하 본 발명의 구성 및 작용을 설명한다.

【발명의 구성 및 작용】

<43> 본 발명은 한국산 겨우살이로부터 증류수를 이용하여 추출물 KM-110을 추출하고 이로부터 암모니아 설페이트 용액을 이용한 침전법으로 단백질 KM-AS 분획을 얻은 단계; 상기 단백질 KM-AS 분획으로부터 렉틴성분 KML-C를 세파로스-48을 충전한 컬럼 크로마토그래피 방법으로 분리한 후 폴리아크릴아미드 겔에서 전기영동하여 분자량을 조사하는 단계; 상기 한국산 겨우살이의 렉틴성분 KML-C과 유럽산 겨우살이의 렉틴성분 EML-1의 생화학적 차이를 규명하기 위해 각각의 등전점(Isoelectric focusing, IEF)을 조사하는 단계; 한국산 겨우살이 추출물 KM-110과 이로부터 분리한 단백질성분 KM-AS 분획을 시료로 사용하여 B16-BL6, Raji 및 마우스의 림프구에 처리하여 세포독성을 검증하는 단계; 한국산 겨우살이 추출물 KM-110과 단백질성분 KM-AS 및 렉틴성분 KML-C의 면역관련 세포의 유사분열물질(mitogen)에 대한 반응성 조사하는 단계; 한국산 겨우살이 추출물 KM-110과 이로부터 분리한 단백질성분 KM-AS의 사이토카인(cytokine) 유도실험을 실시하는 단계; 한국산 겨우살이 추출물 KM-110과 단백질성분 KM-AS 및 렉틴성분 KML-C과 유럽산 겨우살이의 렉틴성분 EML-1의 IL-1 분비유도능을 서로 비교하는 단계; 한국산 겨우살이 추출물 KM-110, 렉틴성분 KML-C, 단백질성분 KM-AS에서 렉틴성분 KML-C를 제거한 나머지 단백질성분 C free-AS 및 유럽산 겨우살이로 렉틴성분 EML-1의 IL-1, IL-6, TNF- α 및 INF- γ 유도능을 조사하는 단계; 상기 렉틴성분 KML-C이 제거된 단백질성분 KM-AS의 INF- γ 유도물질을 헤파린 컬럼을 사용하여 분리하는 단계; 한국산 겨우살이 추출물 KM-110, 렉틴성분 KML-C 및 헤파린 컬럼으로 분리한 단백질 성분 KMHBP의 생체내 급성세포독성을 조사하는 단계; 한국산 겨우살이 추출물 KM-110과 렉틴성분 KML-C의 자연살해세포(Natural killer cell; 이하 NK-세포)활성화 정도를 측정하여 비특이적 면역계에 미

치는 효과를 조사하는 단계; 실험종양전이 모델에서 한국산 겨우살이 추출물 KM-110과 렉틴성분 KML-C의 암전이의 예방 효과를 검증하는 단계; 실험전이 모델에서 한국산 겨우살이 추출물 KM-110과 렉틴성분 KML-C의 종양전이의 치료효과 검증 단계; 한국산 겨우살이 추출물 KM-110과 렉틴성분 KML-C의 종양전이 억제 효과를 검증하는 단계; 한국산 겨우살이 추출물 KM-110과 렉틴성분 KML-C을 마우스에 복강주사한 후 대식세포를 수집하여 종양살해능을 측정하여 대식세포(macrophage)의 활성화능을 조사하는 단계; 한국산 겨우살이 추출물 KM-110과 렉틴성분 KML-C의 NK-세포에 의한 종양전이억제 기전 확

인 단계; 생체내(*In vivo*) 실험모델에서 종양의존성 혈관신생의 억제 효과 검증 단계; 자연폐암전이(spontaneous lung metastasis) 모델에서 한국산 겨우살이 추출물 KM-110과 렉틴성분 KML-C의 KM-110 및 KML-C의 종양전이 억제 효과 검증 단계; 한국산 겨우살이 추출물 KM-110과 렉틴성분 KML-C의 면역증강 효과를 B 세포의 항체생산과 관련된 체액성 면역계에 미치는 효과로 조사하는 단계; 한국산 겨우살이 추출물 KM-110과 렉틴성분 KML-C의 T-세포 매개의 세포성 면역응답을 조사하는 단계; 한국산 겨우살이 추출물 KM-110과 렉틴성분 KML-C의 KLH 항원에 대한 세포성 및 체액성 면역반응의 증가시키는 활성 조사단계; KLH 항원과 함께 한국산 겨우살이 추출물 KM-110과 렉틴성분 KML-C으로 면역화시킨 마우스에 풋패드 종기를 유도한 후 지연성 과민반응을 조사하여 세포성 면역능 증진효과를 조사하는 단계; 한국산 겨우살이 추출물 KM-110의 세포독성 T-세포(CTL)의 활성화에 미치는 효과를 검토하여 종양백신에 대한 보조액으로서의 가능성을 조사하는 단계; 실험종양 전이모델에 X-선으로 불활성화시킨 종양백신과 함께 한국산 겨우살이 추출물 KM-110을 보조액으로 투여하여 상기 종양백신에 대한 보조액(adjuvant)으로서의 가능성을 확인하는 단계; 종양백신과 한국산 겨우살이 추출물 KM-110을 각각 단독으로 또는 동시에 마우스에 면역한 후 마우스의 림프구를 시험관에서 항원인 종양백신으로 재자극하여 유도되는 림프구의 항원에 대한 반응성을 조사하는 단계; Balb/c 마우스를 한국산 겨우살이 추출물의 렉틴성분 KML-C를 프로인트 보조액 및 항원으로 면역화시킨 후 상기 Balb/c 마우스의 비장세포와 P3U1 골수종을 융합하여 하이브리도마 세포주를 얻은 다음 이로부터 단일클론 항체를 얻는 단계; 한국산 겨우살이 추출물 KM-110로

부터 얻은 렉틴성분 KML-C로부터 두 개의 렉틴물질 KML-IIU 및 KML-IIL을 분리하는
 단계; 한국산 겨우살이 추출물 KM-110의 렉틴성분 KML-C과 이로부터 분리된 두 종류의
 렉틴물질 KML-IIU 및 KML-IIL의 당특이성을 적혈구 응집반응과 당에 의한 응집반응 저해
 실험으로 조사하는 단계; 한국산 겨우살이 추출물에 함유된 렉틴물질 KML-IIU 및 KML-IIL의
 아미노산 서열을 분석하는 단계; 한국산 겨우살이 추출물에 함유된 렉틴물질 KML-IIU
 및 KML-IIL의 세포독성을 유럽산 겨우살이 렉틴성분 EML-1과 비교하여 조사하는 단계;
 한국산 겨우살이 추출물에 함유된 렉틴물질 KML-IIU 및 KML-IIL), 유럽산 렉틴성분
 EML-1과 탄알클론 항체(9H7-D10, 8B11-2C5)의 반응성을 조사하고 이 결과를 근거로하여
 각 단일클론항체에 의한 각 렉틴물질의 세포독성 중화효과를 조사하는 단계; 한국산 겨
 우살이 추출물에 함유된 렉틴물질 KML-IIU 및 KML-IIL의 사이토카인 유도능을 유럽산 렉
 틴성분 EML-1의 유도능과 비교하여 조사하는 단계; 한국산 겨우살이 추출물에 함유된 렉
 틴물질 KML-IIU 및 KML-IIL의 종양전이 억제 활성을 세포독성과 사이토카인 유도 활성을
 근거로 하여 조사하는 단계; 한국산 겨우살이 추출물 KM-110과 렉틴물질 KML-IIU 및
 KML-IIL의 면역증강작용을 B형 간염 바이러스에서 병원성을 나타내는 pre-S2 부분을 이
 용한 항체 생산능을 조사하여 비교실험하는 단계; 정제한 한국산 겨우살이의 렉틴물질
 KML-IIU 및 KML-IIL의 아미노산 서열을 기초로 하여 디자인한 프라이머를 가지고 PCR을
 수행하여 한국산 겨우살이 렉틴물질 KML-IIU 및 KML-IIL 유전자를 부분 클로닝하는 단계
 및; 상기 클로닝한 한국산 겨우살이 렉틴물질 KML-IIU 및 KML-IIL 유전자의 부분 염기서
 열과 아미노산 서열을 자동 염기서열 분석기로 결정하는 단계; 기존의

보조액에 한국산 겨우살이 추출물 KM-110을 혼합하여 복합 보조액으로서 면역증강효과를 조사하는 단계; 숙주를 달리하여 얻은 겨우살이로부터 추출한 추출물 KM-110과 렉틴성분 KML-C의 함량 및 각각의 렉틴물질 KML-IIU 및 KML-IIL의 함량을 조사하는 단계; 여러 가지 종양세포에 대해 상기 숙주를 달리하는 겨우살이 추출물의 세포독성 효과를 시험관내에서 측정하는 단계; 헤파린 컬럼에 부착하여 분리한 단백질 KMHBP와 렉틴성분 KML-C의 혼합물 KM의 면역자극효과를 조사하는 단계; 상기 혼합물 KM의 *in vivo* 내 세포독성을 조사하는 단계 및; 상기 혼합물 KM의 종양전이 억제효과를 조사하는 단계로 구성된다.

<44> 이하, 본 발명은 하기 실시예를 통하여 상세히 설명하지만 본 발명의 권리범위가 이들 실시예에 의해 제한되는 것은 아니다.

<45> 실시예 1: 겨우살이 추출물 KM-110 및 단백질 성분 KM-AS의 분리

<46> 본 실험에 사용한 겨우살이는 한국에서 서식하는 겨우살이로서 1월에 채취한 것을 사용하였다. 실험에 사용된 겨우살이는 1년 및 2년생으로서 가지의 끝에서 부터 두 마디까지의 잎, 줄기 그리고 열매를 겨우살이로부터 절단하여 증류수로 충분히 세척하여 건조시킨 다음, 진공 포장하여 추출시까지 -80℃에서 보관하였다. 동결된 겨우살이 잎과 줄기를 세절한 후 믹서(blender)에서 다시 혼합한 후 5배 부피의 증류수로 4℃에서 8~12시간 동안 교반하였다. 그 후 10,000rpm으로 4℃에서 30분 동안 원심분리하여 얻은 상등액을 구멍크기(pore size)가 다른 멤브레인 필터(membrane filter)에 의해 순차적으로 여과한 후(7.2, 0.45, 0.22mm) 내액을

동결건조시켜 갈색의 분말(KM-110)을 얻었다. 한국산 겨우살이로부터 KM-110의 회수율은 약 10%였다. 이 동결 건조물은 PBS로서 10mg/mL의 농도로 조정하여 스탁 용액(stock solution)으로 만든 후, -20℃에 저장하여 실험에 사용하였다. 한국산 겨우살이로부터 얻은 단백질 분획 조제는 70%의 포화된 암모니아 설페이트(ammonium sulphate)용액을 이용한 침전법을 이용하였다. 즉, 한국산 겨우살이를 0.15M 염화나트륨(NaCl)을 함유하는 인산염 완충용액(phosphate buffer, 이하 PBS: pH7.4)에서 KM-110의 제조와 동일한 방법으로 교반 후, 암모니아 설페이트 파우더(ammonium sulphate powder)를 첨가시켜 70%의 암모니아 설페이트 포화 용액을 만들고 4℃에서 약하게 교반시켜 단백질 성분을 침전시켰다. 이 침전물을 PBS로 용해한 후, 동일한 버퍼에서 2일간 버퍼를 바꾸어 가며 투석시켰다. 그 후 15,000g에서 30분간 원심분리를 하여 얻은 상등액을 취하여 0.45mm의 멤브레인 필터에서 여과함으로서 KM-AS의 분획을 얻었고, 단백질 에세이 키트(protein assay kit: Boehringer Mannheim사)를 이용하여 단백질 정량을 한 후 -20℃에서 실험할 때까지 보관하였다. 겨우살이로부터 KM-AS의 회수율은 0.3~1.5%이다.

<47> 실시예 2: 렉틴성분 KML-C의 분리와 분자량 조사

<48> KM-AS로부터 KML-C의 분리는 50℃에서 3시간 동안 0.2M 염산(HCl)으로 가수분해시킨 세파로스-4B(sepharose-4B)를 충전한 컬럼 크로마토그래피(column chromatography)방법으로 실시하였다. 실시예 1의 KM-AS를 컬럼(column)에 통과시키고, 컬럼용적(column volume) 5배의 PBS로서 280nm의 흡광도(O.D)값이 0이 될 때

까지 컬럼을 세척하였으며, 컬럼에 결합된 물질을 0.1M 락토오스(lactose)가 포함된 PBS로 용출하였고, PBS에 대한 투석으로 락토오스(lactose)성분을 제거하였고, 이 물질을 KML-C라고 칭하였다(도 1의 A). KML-C의 분자량 및 순도를 측정하기 위하여 0.1% SDS를 함유하는 13% 폴리아크릴아미드 젤(polyacrylamide gel)에서 전기영동을 실시하여 표준 단백질들과 비교하였다(도 1의 B). 각 시료는 2-메르kap토에탄올(2-mercaptoethanol, 이하 2-ME)을 처리한 비환원상태와 2-ME를 처리한 환원상태로 준비하여 전기영동을 실시하였다. 도 1의 B에 나타낸 바와 같이 전기영동 결과 KML-C는 환원상태에서는 각각 약 33.2, 31. 28.6, 25.5KD의 분자량을 가지는 4개의 밴드가 확인되었고, 비환원상태에서는 ~~61.8KD와 56.4KD~~의 두개의 밴드가 나타났다. 이 결과로서 ~~KML-C~~는 두개의 단백질로 구성되어 있음을 확인하였으며, 각각의 단백질을 각각 KML-IIU(분자량 61.8KD) 및 KML-II L(분자량 ~~56.4~~ 55.4 KD)로 명명하였다. 한편, 대조군으로 사용한 유럽산의 EML-1은 비환원상태에서 분자량이 약 60KD, 환원조건에서는 34KD 및 27KD의 밴드를 나타내 각각의 밴드가 이황화물(disulfate)결합에 의해 연결되어 있다는 기존의 보고와 일치하는 결과를 나타내었다. 현재까지 유럽산 겨우살이는 분자량 및 당 특이성에 따라 EML-I 외에도 2가지 즉, EML-II 및 III 등 3가지의 생물학적 활성이 있는 렉틴(lectin)들이 보고되어 있다. EML-II는 32KD 및 27KD의 각 체인(chain)으로, EML-III는 30KD과 25KD의 체인으로 구성되어 있는 것으로 알려져 있다. 따라서 KML-C를 구성하는 각 체인은 유럽산 겨우살이의 어떠한 렉틴과도 분자량에서 차이가 있는 결과를 나타냈다.

<49> 실시에 3: 등전점(Isoelectric focusing, IEF)조사 분석

<50> 한국산 겨우살이의 KML-C와 유럽산인 EML-1 분획의 생화학적 차이를 규명하기 위하여

등전점 조사를 실시한 결과, 유럽산의 EML-1의 경우 pH6.6~7.0 사이에서, 한국산인 KML-C의 경우 pH8.0~9.0의 범위에서 IP값(value)을 나타내므로 구성 아미노산에 의한 단백질의 생화학적 특성이 다른 것으로 확인되었다.

<51> 실시예 4: KM-AS 분획의 세포독성 효과

<52> 물에 의하여 추출된 KM-110의 성분 중 시험관내(*in vitro*)에서 여러 세포에 직접적 살해활성을 나타내는 성분에서 단백질 성분의 비율을 조사하고자 KM-110 및 KM-AS에 의한 세포독성 효과를 조사하였다. 세포독성 효과측정은 1×10^4 /웰(well)로 조정된 세포에 시료를 처리하고 3일간 배양 후, 배양종료 6시간 전에 $0.5 \mu\text{Ci}/50\text{mL}$ 의 $[^3\text{H}]\text{-TdR}$ 을 넣고 배양한 후, 생존한 세포가 흡수한 $[^3\text{H}]\text{-TdR}$ (Filtermate 196; Packard Instrument사, Meriden, CT)의 양을 Matrix 96 direct beta counter(Packard Instrument사)로 측정하였다. KM-110이 함유하는 단백질 농도를 단백질 분석 키트(protein assay kit, Belinger manheim사)에 의하여 측정한 결과 10mg의 KM-110은 $150 \mu\text{g}$ 의 단백질 성분을 함유하였다. KM-AS의 단백질 농도를 조정하여 KM-110의 단백질 함량과 동일한 농도로 조정 후 세포와 함께 배양 후 얻은 결과를 도 2에 나타냈다. 만약 KM-110내에 비단백 성분이 세포독성 효과를 나타낸다면 KM-110에 의한 세포독성 효과가 KM-AS에 의한 활성보다 높아야 할 것이다. 그러나, 결과에 나타난 바와 같이 단백질 농도로 나타낸 KM-110 및 KM-AS간의 B16-BL6, Raji 및 마우스의 림프구(lymphocytes)에 대한 세포독성 효과는 거의 유사한 결과를 나타냈기에 KM-110에서 세포독성을 나타내는 물질은 단백질 성분인 것으로 사료되었다.

<53> 실시에 5: 면역관련 세포의 유사분열물질(mitogen)에 대한 반응성

<54> 6주령된 Balb/c(암컷)마우스 3마리를 한 그룹으로 하여 100 μ g의 KM-110을 주사(i.v.)하고 1, 3, 5일 후에 비장세포(splenocytes)를 분리하였다.

<55> 바닥이 평평한 96-웰 배양 플레이트(well culture plates, Nunc, Denmark)에 각 비장세포(splenocytes)를 5 x 10⁵/100 μ l의 밀도로 각 웰(well)에 넣고, T세포 및 B세포의 유사분열물질(mitogen)로 알려진 Con. A와 LPS를 각각 0.5 및 5 μ g/mL의 농도로 100 μ l씩 각 웰(well)에 처리한 후 5% CO₂, 37 $^{\circ}$ C의 조건에서 3일간 배양하였다. 배양 종료 6시간 전에 0.5 μ Ci의 [³H]-TdR을 50 μ l씩 첨가 후, 배양세포를 Filter mate 196(Packard Instrument, Meriden, CT)에 의해 글라스 필터(glass filter)에 흡착시킨 뒤, Matrix 96TM Direct Beta Counter(Packard)에서 방사선 활성을 측정하였다. 도 3에 나타난 바와 같이 KM-110의 투여는 여러 기관의 면역담당세포들(lymphocytes)의 자극에 직접적으로 관계하는 결과를 나타내었다. 정상 마우스의 림프구에 비하여 KM-110이 투여된 마우스의 림프절(LN), 말초혈액(PL), 비장의 림프구(SP)는 시험관내(in vitro) B- 및 T-세포에 대한 유사분열물질(mitogen)인 Con.A 및 LPS와 함께 배양을 한 경우, KM-110을 투여하지 않은 대조군의 마우스에 비하여 림프구의 DNA합성 증진효과를 나타냄으로서 유사분열물질(mitogen)에 대한 유효한 반응성이 나타났다. 이 반응성은 KM-110투여 1일 후부터 증가하여 투여 3일째에는 정상마우스에 비하여 2배 이상의 유효한 상승효과가 나타났고, 5일째부터는 그 반응성이 감소하는 경향을 나타냈다. 그러나 미성숙 세포인 골수전구세포(bone marrow cells; BM)는 유효한 반응성을 나타내지 않았기에 KM-110은 성숙된 면역담당세포에 작용을 하는 것으로 사료되었다. 100 μ g의 KM-110 단백질농도를 측정한 결과

1.5 μ g의 단백질을 함유되는 것으로 나타났으므로 KM-110의 성분에서 단백질 분획만의 활성을 조사하기 위하여 동량의 KM-AS를 마우스에 투여하였다. 결과에 나타난 바와 같이 각각의 시료를 투여한 마우스의 비장세포는 유사분열물질(mitogen)을 첨가하지 않은 경우에서도 시료 무처리 대조군에 비해 DNA의 합성이 증가되는 결과를 나타내어 각 시료의 투여가 마우스의 비장세포를 생체내(*in vivo*)에서 자극한다는 것이 인정되었고, 이때 유사분열물질(mitogen)을 첨가할 경우 유사분열물질의 반응성을 증가시키는 것으로 사료되었다. KML-C를 투여한 경우 유사분열물질에 대한 반응성은 KML-C의 농도에 비례하는 결과가 나타났고 이를 도 4에 나타내었다. KM-110내에서 면역관련 세포를 활성화시키는 성분은 단백질 성분 중에서 분리된 렉틴(lectin)물질인 KML-C임을 강하게 시사하였다. 이상의 결과를 종합하여 볼 때 KM-110 및 그의 분획은 성숙된 숙주의 면역 담당세포들이 효과적인 면역반응을 위한 일련의 세포성 반응성을 증진시키는 효과를 가지고 있으며, 만약 외부로부터의 항원에 노출되었을 경우 유도되는 항원 특이적 면역반응을 위한 작동세포의 수를 증폭시킴으로서 항원에 대한 효과적인 면역반응이 유도되는 것으로 사료된다.

<56> 실시예 6: KM-110, KM-AS, KML-C의 사이토카인 유도실험

<57> Balb/c 마우스에 1% 티오글리콜산염(thioglycollate)을 1mL 복강주사하고, 4일 후에 경추탈골 방법으로 마우스를 안락사 시킨 후, 복강에 RPMI 1640 배지 10mL를 주입하고 복벽을 가볍게 두드려 복강내 세포를 잘 섞이게 한 후, 복강내세포(peritoneal exudative cells; PEC)를 수집하였다. 수획한 PEC를 24개의 웰배양플레이트(well culture plate)에 1.5x10⁶의 농도로 조정하여 플레이팅(plating)하였다. 2시간 동안 배양 후, 플레이트

(plate)에 부착된 대식세포(macrophage)에 여러 농도의 KM-110, KM-AS를 넣고 24시간 동안 대식세포를 자극하였다. 자극 완료 후 배양 상등액에 유도된 사이토카인(cytokines)인 IL-1의 유도는 바이오에세이(bioassay)에 의한 IL-1활성을 자세히 검토한 후 ELISA 키트(kit)에 의하여 유도된 IL-1을 확인하였고(도 5), 그 결과에 의거하여 다른 사이토카인(cytokine)인 $\text{TNF-}\alpha$, IL-6, $\text{IFN-}\gamma$ 의 측정은 ELISA 키트(kit, ENDOGEN)를 이용하였다(도 8).

<58> 비교실시예 1: IL-1의 유도

<59> 도 5의 A에서 보는 바와 같이 $100\mu\text{g}\sim 1\mu\text{g/mL}$ 의 농도로 1시간 자극 후, 새로운 배양액을 첨가하여 24시간 동안 배양한 대식세포(macrophage) 배양상등액은 대조군인 LPS의 경우와 비교하여 유효한 IL-1의 활성을 나타내었다. 이 결과에 의거하여 KM-110의 각 농도에 따른 활성을 경시적으로 검토하였다. 도 5의 B에 나타낸 바와 같이, $100\sim 10\mu\text{g/mL}$ 농도로의 자극은, 자극 후 10시간에서는 거의 동등한 IL-1활성을 나타내었고, 정점에 도달하였지만 자극 초기단계(5시간까지)에서는 $50\mu\text{g/mL}$ 의 농도가 가장 높은 활성을 나타내었다. 한편, $500\mu\text{g/mL}$ 농도에서는 자극 24시간 후까지 유의할 만한 IL-1활성이 나타나지 않았으나, $1\mu\text{g/mL}$ 의 농도에서는 자극 24시간 후에는 IL-1활성이 인정되었다. 이상의 결과로서 KM-110에 의한 IL-1의 분비유도 양식은 $10\sim 100\mu\text{g/mL}$ 의 농도에서 가장 유효하였으며 $1\mu\text{g/mL}$ 농도까지는 IL-1활성이 유지되는 것으로 판단되었다. IL-1의 유도와 관련된 KM-110의 활성성분을 검토하기 위하여, 그의 단백질 성분이 KM-AS에 의한 IL-1 분비유도능을 조사하였다. 본 실험에 사용된 KM-AS의 단백질의 양은 0.25mg/mL 이었다. 도 5의 C에서, 이 분획물을 100배 희석법으로 희석한 뒤, IL-1의 활성을 조사한 결과 KM-110

의 단백질 성분인 KM-AS도 IL-1의 유도 활성이 있는 결과를 나타내어 KM-110에서 IL-1 유도인자(inducer)로 작용한 물질은 단백질 성분임이 확인되었다. 또, KM-AS에서 분리한 KML-C의 IL-1의 유도 활성은 도 6에 나타내었다. 결과에 나타난 바와 같이 대식세포(macrophage)의 KML-C에 의한 IL-1유도활성은 KML-C의 농도 50ng/mL부터 1ng/mL까지 유의하게 나타났으며 KML-C농도에 의존적인 경향을 나타내었다. 이상의 결과로서 겨우살이 성분들로 자극된 대식세포(macrophage) 배양상등액은 흉선 T-세포를 활성화시키는 IL-1의 활성이 있음을 바이오에세이(bioassay)에 의하여 확인하였고 그 성분은 주로 KML-C에 의한 결과를 나타냈다. IL-1활성을 나타내는 배양상등액의 IL-1의 유도분비의 확인은 ELISA법으로 조사하였다. ELISA kit로 IL-1 에세이(assay)를 위한 시료의 대식세포(macrophage)자극농도는 바이오에세이(bioassay)에서 유효하게 IL-1활성을 유도한 농도 (KM-110; 10 μ g/mL, KML-C; 10ng/mL)였고, 대조군으로 유럽산 렉틴(lectin)성분인 EML-1(10ng/mL)을 사용하였다. 도 7의 결과에 나타난 바와 같이 각 시험물질로 자극한 대식세포(macrophage)의 배양상등액 내에는 IL-1이 유도되었으며, KML-C는 KM-110의 IL-1분비유도에 있어서 가장 중요한 활성물질 중의 하나인 것으로 사료되었다. 그리고 KML-C와 EML-1의 직접비교에서 KML-C가 EML-1에 비하여 높은 IL-1 유도능을 나타내어 KML-C가 EML-1에 비하여 사이토카인 유도인자(cytokine inducer)로서 높은 활성을 가지는 것으로 사료되었다.

<60> 비교실시예 2: TNF- α , IFN- γ 및 IL-6의 유도

- <61> 대식세포(macrophage) 배양상등액을 이용하여 KM-110, KML-C 및 EML-1, 그리고 KML-C가 제거된 단백질 분획(C free-AS)에 의한 TNF- α , IL-6 및 IFN- γ 의 분비 유도능을 조사

하여 도 8에 나타내었다. 도 8의 결과와 같이 KM-110, KML-C 및 C free-AS는 대식세포로부터 IL-6 및 TNF- α 의 유도능이 확인되었고, KML-C의 활성이 EML-1에 비하여 더 높은 것으로 사료되었다. IFN- γ 의 경우, KML-C에 의한 IFN- γ 의 유도능은 없는 결과가 나타났으나, C free-AS 분획은 KM-110 만큼의 IFN- γ 유도 분비능이 있었다. 이 결과에서 IFN- γ 를 유도하는 물질은 렉틴(lectin)인 KML-C 분획이 아닌 다른 단백질 성분인 것으로 사료되었다. 물러(Mueller) 등은 겨우살이 성분 중에서 당류 및 저분자 물질 등이 IFN- γ 의 유도 및 NK-세포의 종양세포 살해능을 증진시키는 효과가 있는 것으로 보고하였고, 겨우살이에는 렉틴(lectin) 이외의 활성성분이 존재한다는 것을 강하게 제시하였으며, IFN- γ 를 유도하는 활성성분으로 당류 및 저분자 펩타이드(peptide)를 보고하였다. 실제로, 본 실험에 있어서도 KML-C로 자극된 대식세포 배양상등액은 IFN- γ 이 유도되지 않은 결과를 나타내었다. 이 결과에서 대식세포(macrophage)를 자극하여 IL-1, IL-6, TNF- α 및 INF- γ 를 유도하는 KM-110의 활성은 주로 그의 단백질 분획인 KM-AS에 의한다는 것이 확인되었다. 또, KM-AS를 구성하는 성분 중에서 IL-1, IL-6, TNF- α 의 유도는 주로 렉틴(lectin)성분인 KML-C가 관여하는 것으로 확인되었으나 INF- γ 의 유도인자(inducer)로는 작용하지 않는 결과를 나타냈다. 따라서, KM-110은 KML-C 외에도 다른 활성성분이 함유하는 것으로 사료되었고, 따라서 KM-110의 활성성분에서 IFN- γ 를 유도하는 성분에 대하여 좀더 자세한 연구의 필요성이 요구되었고 그 결과를 실시예 7에 나타냈다.

<62> 실시예 7: KM-AS로부터 INF- γ 유도물질의 조사

<63> KM-110, KM-AS에서 유도되는 대부분의 사이토카인(cytokines)이 렉틴(lectin) 분획인

KML-C만으로도 유도되었으나 IFN- γ 의 유도제로는 작용하지 않는 것으로 실시예 6에서 확인되었기 때문에 KM-AS에서 KML-C이외의 IFN- γ 의 유도물질을 탐색하는 것이 요구되었다. IFN- γ 의 유도물질 탐색을 위한 재료물질은 도 8의 결과에 제시한 것처럼, KML-C가 제거된 KM-AS 분획인 C-free AS는 유효하게 IFN- γ 을 유도하는 활성을 나타냈기에 이 분획을 이용하였다. IFN- γ 의 유도인자(inducer)를 분리하기 위하여 헤파린 컬럼(heparin column, Pharmacia사)을 사용하였다. KML-C가 제거된 KM-AS 분획인 C-free-AS를 인산염 완충용액(phosphate buffer, 0.01M, pH7.4)에 용해시킨 후, 헤파린 컬럼(heparin column)에 적용하고 동일한 버퍼를 이용, 컬럼에 결합되지 않은 물질이 완전히 제거될 때까지 충분히 세척하였다. 세척 완료 후, 동일한 버퍼에 염화나트륨(NaCl)의 농도를 순차적으로 높이면서(10mM~1M) 컬럼에 결합된 물질을 용출하였다. 도 9는 염화나트륨 농도에 의존적으로 용출된 분획의 크로마토그램(chromatogram) 결과이다. 결과에 나타난 바와 같이 헤파린 컬럼(heparin column)으로 분리된 물질이 순수하게 분리되지는 않았지만 염화나트륨(NaCl)농도에 따른 용출 분획의 전기영동 양상(pattern)이 다른 결과가 나타났기에 헤파린(heparin)과의 친화성(affinity)이 서로 다른 특성을 지니는 물질이 용출되었다는 것을 시사하였다. 다음 실험으로서 각각의 분획이 IFN- γ 를 유도하는 활성이 있는지를 조사하였다. IFN- γ 의 유도는 실시예 6과 동일한 방법에 의하여 조사하였고 그 결과는 도 10에 나타냈다. 그 결과 IFN- γ 를 유도하는 활성이 있는 분획은 주로 100mM의 염화나트륨이 함유된 버퍼로 용출된 분획이었다. 따라서, IFN- γ 의 유도인자(inducer)는 주로 헤파린(heparin)에 결합하는 단백질(Korean mistletoe heparin binding protein; KMHP) 성분 중에서 주로 100mM의 염화나트륨에 의하여 용출되는 분획임을 확인하였다. 따라서 가장 유효한 면역자극 활성을 유도하기 위해서는 렉틴(lectin)

성분인 KML-C외에도 기타 단백질 성분 등 조사되지 않은 활성물질이 존재함을 강하게 시사하였다. 이 관점에서 본 발명자들이 제시하는 렉틴(lectin) 외의 성분은 헤파린에 결합하는 성분 외에도 당 성분, 저분자 펩타이드 성분, 그리고 미량의 알칼로이드(alkaloids), 플라보노이드(flavonoids), 비타민(vitamin) 등이 관여될 것으로 생각한다

<64> 실시에 8: KM-110 및 각 분획의 생체내(in vivo) 급성독성 조사

<65> 참나무에서 기생하는 겨우살이 추출물 각 분획인 KM-110, KML-C 및 KMHBP의 급성독성효과를 마우스에서 조사하였다. 6주령의 Balb/c(female)에 KM-110의 경우 1.5, 1.0mg을, KML-C의 경우 5, 2.5, 1.25, 0.62 μ g을, KMHBP 중 100mM의 염화나트륨 용액에서 용출된 분획(이하 KMHBP-100로 함)의 경우 100, 50, 25 μ g을 정맥주사(intravenous)하고 7일간 마우스의 생존율 및 체중을 조사하였다. 각 실험군 마우스는 각각 10마리씩 실시하였다. 실험결과, 표 1에는 생존율을 나타냈고 표 2에는 체중의 변화를 나타냈다. 즉, 표 1에서 보는 바와 같이 겨우살이 수추출물인 KM-110을 투여한 경우에는 1.5mg/마우스 그룹에서는 투여후 24시간 이내에 마우스가 모두 폐사하였으나 그 이하의 농도인 1.0mg/마우스의 군에서는 폐사한 마우스가 없었다. KM-110의 투여 후 모두 생존한 1.0mg을 투여한 마우스의 체중변화는 표 2에 나타낸 바와 같이 투여 3일 째에 약간 감소하는 경향을 보이다가 5일 째부터 정상적인 상태로 회복되어 실험종류 시기인 7일 후에는 외형상의 이상은 발견할 수

없었다. 따라서 KM-110의 급성독성을 나타내는 LD₅₀ 값은 1.5 ~ 1.0mg/마우스(약 1.25mg/마우스)인 것으로 추정되었다. KML-C 분획의 경우 5 및 2.5 μ g/마우스를 투여한 그룹의 마우스는 극심한 입모 및 무기력증을 보이다가 2일내에 모두 폐사하였으며, 1.25 μ g/마우스를 투여한 그룹에서는 1일째에는 폐사동물이 없었으나 2일째나 3일째에 각각 2마리 및 1마리가 폐사는 결과를 보였다. 또 표 2에서 보는 바와 같이 체중의 변화는 1.25 μ g을 투여한 경우 마우스의 체중은 투여 3 ~ 5일에 약 5% 정도 감소하였고 발열반응에 기인되는 것으로 사료되는 입모 및 무기력증상이 보였다. 그러나 투여 6일째부터는 정상상태로 돌아와 다시 체중이 증가하는 경향을 보였다. 0.625 μ g/마우스의 경우는 정상 마우스와 비교하여 어떠한 이상증상이 발견되지 않았다. 따라서 KML-C의 LD₅₀ 값은 약 1.25 μ g/kg 전후로 추정되었다. KMHBP-100의 경우 50 μ g/마우스를 투여한 군에서는 투여 1일 후에 모든 마우스가 폐사하였으나 20 μ g 이하를 투여한 군에서는 체중의 감소나 다른 이상증세가 없었다. 따라서

<66> KMHBP-100의 LD₅₀ 값은 약 50 ~ 20 μ g/kg 사이로 추정되었다.

<67>

【표 1】

겨우살이 시료	각 분획의 용량	투여에 의한 마우스의 치사율 날 짜 / 생존율(%)							결 과 (%)
		1일	2일	3일	4일	5일	6일	7일	
KM-110	1.5mg	0	-	-	-	-	-	-	0
	1.0mg	100	100	100	100	100	100	100	100
KML-C	5 μ g	40	0	-	-	-	-	-	0
	2.5 μ g	80	0	-	-	-	-	-	0
	1.25 μ g	100	60	60	60	40	40	40	40
	0.625 μ g	100	100	100	100	100	100	100	100
KMHBP	100 μ g	0	0	0	0	0	0	0	0
	50 μ g	80	70	70	70	70	70	70	70
	25 μ g	100	100	100	100	100	100	100	100

<68> 【표 2】

각 분획의 정맥투여에 의한 시료	투여량	체중변화 날 짜/평균무게(g) 표준편차			
		1일	3일	5일	7일
대조군	-	20.2 \pm 0.5	20.3 \pm 0.6	20.3 \pm 0.7	20.5 \pm 0.6
KM-110	1.5mg	-	-	-	-
	1.0mg	20.0 \pm 0.8	19.8 \pm 0.6	20.0 \pm 0.8	20.1 \pm 0.9
KML-C	5 μ g	19.5 \pm 0.7	-	-	-
	2.5 μ g	19.4 \pm 0.5	-	-	-
	1.25 μ g	19.6 \pm 0.4	19.0 \pm 0.6	19.1 \pm 0.7	19.4 \pm 0.5
	0.625 μ g	20.0 \pm 0.5	19.7 \pm 0.6	20.0 \pm 0.6	20.1 \pm 0.6
KMHBP	50 μ g	-	-	-	-
	20 μ g	20.2 \pm 0.7	20.2 \pm 0.7	20.3 \pm 0.9	20.4 \pm 0.8
	12.5 μ g	20.5 \pm 0.7	20.5 \pm 0.8	20.6 \pm 0.8	20.6 \pm 0.9

<69> 실시예 9: NK-세포의 활성 측정

<70> 자연살해세포(Natural killer cell; 이하 NK-cell)는 면역특이성 없이 광범위하게 세포 독성 효과를 나타내는 중요한 면역기구로서 여러 종양에 대하여 광범위한 살해능을 나타내는 작동세포로 알려져 있다. 따라서 KM-110 및 KML-C의 항종양 활성과 관련된 비특이적인 면역계에 미치는 효과를 조사하고자 각 시료를 주사한 마우스 비장세포의 NK-세포

활성에 관하여 조사하였다. 실험방법은 마우스에 KM-110 혹은 KML-C를 정맥주사 후 비장을 취하고 NK-감각(sensitive) 세포로 알려진 YAC-1 세포를 동시배양 하면서 마우스 비장의 NK-세포에 의한 YAC-1 세포의 살해정도를 측정하였다. YAC-1의 살해정도를 측정하기 위하여 YAC-1 세포에 미리 ^{51}Cr 을 표지하였고 비장세포는 YAC-1에 대하여 100, 50, 25 및 12.5배가 되도록 조정한 후 6시간 배양하였다. 배양종료 후 NK-세포에 의하여 살해된 표적세포(YAC-1)가 유리한 ^{51}Cr 의 양을 측정하였으며, NK 세포의 종양세포 살해능은 다음 식에 의하여 구하였다.

$$\text{NK 활성(\%)} = [\text{실험적 유리량(experimental release)} - \text{자연적 유리량 (spontaneous release)} / \text{최대 유리량(maximum release)} - \text{자연적 유리량 (spontaneous release)}] \times 100$$

<71> 먼저 100 μg 의 KM-110을 정맥투여 후 1~5일까지의 NK-세포 활성의 변화를 조사하였다. 도 11의 A에 나타난 바와 같이 KM-110의 투여 후 1일부터 3일까지의 마우스 NK-세포의 살해능은 대조군에 비하여 2배 이상 증가하였다. 그러나 KM-110 투여 후 5일부터는 정상 마우스의 수준으로 되돌아가는 현상을 나타내었다. 도 11의 B 결과는 NK-세포의 활성을 증진시키는 KM-110의 적정농도를 구하기 위하여 여러 농도의 KM-110을 투여하고 3일 후에 NK-세포의 활성을 조사하였다. 결과에 나타난 바와 같이 NK-활성을 증진시키는 KM-110의 유효농도는 100~10 μg /마우스인 것으로 사료되었다. 다음 실험으로서 KML-C의 NK-세포에 미치는 활성을 YAC-1의 증식 억제

효과로 조사하였다. 실험에 적용한 KML-C의 양은 마우스 당 50~2ng이었다. 도 12에 나타난 바와 같이 KML-C의 경우 50~10ng의 투여에서 유효한 NK-세포의 종양세포 살해능이 나타났다. 도 11과 12에서 E/T ratio는 비장세포가 YAC-1에 대하여 100, 50, 25 및 12.5배가 되도록 조정한 것을 나타낸다. 본 실험에서 대조군으로 사용한 KM-110 혹은 KM-AS의 경우도 KML-C와 비슷한 정도의 NK-활성을 나타냄으로서 KM-110의 NK-세포 활성을 증진시키는 주요 성분은 KML-C로 사료된다.

<73> 실시예 10: 실험종양전이 모델에서 KM-110과 KML-C의 암전이의 예방 효과

<74> Balb/c 및 C57BL/6 마우스에서 폐(lung)로의 높은 전이력을 가진 결장(Colon) 26-M3.1 폐암(lung carcinoma), B16-BL6 흑색종(melanoma) 종양세포주와 CDF1 마우스의 간(liver)과 비장(spleen)에 대하여 전이력을 획득한 L5178Y-ML25 임파종(lymphoma)세포주를 이용하여 동물실험종양전이모델에서 KM-110 및 KML-C에 의한 종양전이 억제효과를 조사하였다. 성숙한 마우스에 정맥주사로 KM-110의 100 μ g를 투여함과 경구투여로 50mg까지는 생체에 직접적인 부작용이 없는 것으로 밝혀졌으므로 이 농도 이하에서 겨우살이로부터 추출한 추출물이 종양전이억제에 미치는 영향을 조사하였다.

<75> 첫째로, KM-110이 종양에 대한 자연면역(natural immunity)능을 상승시키는 지에 대한 조사를 위하여 종양접종 전에 KM-110을 투여하였다. 표 3에 나타나 있듯이 종양접종 2일 전의 KM-110의 투여(i.v.)는 결장(colon)26-M3.1 폐종양(lung carcinoma), B16-BL6 흑색종(melanoma)에 의한 종양 전이를 80% 이상 억제하였으며

4일전의 투여도 유효한 종양전이억제 효과를 나타내었다. L5178Y-ML25 임파종(lymphoma)에 의한 간 및 비장의 전이에 있어서도 각 시료는 유효한 전이억제능을 나타냄으로서 KM-110은 여러 종류의 종양세포에 대한 자연 면역능을 상승시키는 활성이 있는 것으로 사료되었다(표 4).

<76> KM-110의 종양전이 억제능을 자세히 검토하기 위하여 KM-110의 투여 농도 및 투여방법에 따른 효과를 조사하였다. 종양의 전이를 효과적으로 억제하는 농도를 조사하기 위하여 여러 농도의 KM-110을 정맥(i.v.), 피하(subcutaneous; s.c.), 경구(oral; p.o.) 및 경비(intranasal; i.n.)주사로 종양접종 2일전에 투여 후의 결과를 도 13에 나타내었다

<77> 【표 3】

처 리	B16-BL6 흑색종 또는 결장 26-M3.1 암세포의 정맥주사 후 생성된 폐암전이에 대한 KM-110의 예방효과. 폐암전이수(저해 %)			
	B16-BL6		결장 26-M3.1	
KM-110	평균치 ± 표준편차	레인지	평균치 ± 표준편차	레인지
무처리(PBS)	238 ± 33	(200 - 286)		
종양접종 4일전 투여	129 ± 30 (45.8)*	(134 - 154)	159 ± 9	(152 - 165)
종양접종 2일전 투여	72 ± 25 (69.7)**	(43 - 88)	30 ± 22 (80.4)**	(4 - 52)

주) * P<0.01; ** P< 0.001, 대조군과 비교하였을 때(by Student's two-tailed t test)

<78>

【표 4】

L5178Y-ML25 임파종 세포의 정맥주사에 의해 생성된 간과 비장전이에 대한 KM-110의 예방효과 처리	평균치 무게(g) ±표준편차, (% 저해)	
	간(liver)	비장(spleen)
무처리(PBS)	4.58 ± 0.67	0.24 ± 0.03
종양접종 4일전	2.79 ± 0.14 (31.9)*	0.17 ± 0.02 (29.2)*
종양접종 2일전	2.69 ± 0.82 (31.9)*	0.15 ± 0.02 (29.2)*
정상적인 마우스	1.01 ± 0.1	0.08 ± 0.02

주) * P < 0.001, 대조군과 비교하였을 때 (by Student's two-tailed t test)

<79> 도 13의 A와 B에서 보듯이 전신투여인 정맥 및 피하주사의 경우 10 μ g의 투여까지 유효한 종양전이 억제효과가 있었고, 특히 정맥주사에 의한 50~100 μ g의 투여는 대조군에 비하여 80% 이상 높은 전이억제 효과를 나타냈으며, 피하주사에서도 60% 이상의 종양전이 억제효과를 나타내었다. 도 13의 C와 D에서 500, 250, 50 μ g의 경구투여는 64.4, 65.8, 53.4%의 종양전이억제 효과를, 5 μ g의 경비투여 역시 종양의 전이를 유효하게 억제 (48.6%)하는 효과가 인정되었다. 점막기관으로의 투여인 경구 및 경비투여의 경우에서도 종양의 전이가 유효하게 억제되는 것은 흥미로운 사실로서, KM-110의 종양에 대한 점막면역능을 상승시키는 활성이 있음을 강하게 시사하는 결과로 사료되었다. 경비투여의 경우 50 μ g의 농도에서 종양전이억제 효과가 나타나지 않는 것은 KM-110의 비강점막세포에 대한 직접적인 세포독성 효과에 의한 결과로 생각되었다.

<80> 실시예 11: 실험전이 모델에서 KM-110의 종양전이의 치료효과

<81> KM-110에 의한 종양전이의 예방효과가 인정되었기에, 동일한 실험 모델을 이용하여

KM-110의 종양전이 치료효과를 조사하였다. 표 5의 결과에서 보듯이 100 μ g의 KM-110을 종양 이식 1일 후에 정맥 및 피하주사에 의해 투여한 결과, KM-110의 투여 마우스는 결장(colon) 26-M3.1의 전이를 대조군에 비하여 각각 49.6 및 43.3% 정도로 유의하게 ($p < 0.01$) 억제하였다. B16-BL6 흑색종(melanoma)에 대한 동일한 실험에서도 KM-110의 투여는 다소의 전이억제 효과를 나타내었다. 이상의 결과로 실험동물 종양전이 모델에서 종양이식 후 각 시료의 1회 투여는 결장(colon)과 흑색종(melanoma)에 의한 폐로의 전이를 유효하게 억제하였다.

<82> 【표 5】

B16-BL6 흑색종 또는 결장 26-M3.1 암세포의 정맥 접종에 의해 생성된 폐암 전이에 대한 KM-110의 예방효과

처리	주사접종 경로	전이수(평균치 ± 표준편차)			
		결장 26-M3.1		B16-BL6	
		평균치 ± 표준편차	레인지	평균치 ± 표준편차	레인지
대조구	무처리	127 ± 9	116 - 139	76 ± 13	57 - 102
KM-110	피하주사	72 ± 27 (43.3) ^a	40 - 100	60 ± 5	53 - 64
KM-110	정맥주사	64 ± 27 (49.6) ^a	37 - 90	46 ± 13 (39.5) ^a	32 - 59

주) * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$, 대조군과 비교하였을 때(by student's two-tailed t test)

<83> 표 6에는 L5178Y-ML25 임파종(lymphoma)의 간(liver) 및 비장(spleen)으로의 종양전이에 미치는 KM-110의 영향에 관한 결과를 나타냈다. KM-110은 간 및 비장으로의 임파종(lymphoma)전이를 각각 78.4% 및 58.3% 씩 유의한 전이억제력을 나타냈다. 따라서 다음 실험으로 KM-110의 항종양 전이활성을 자세히 검토하기 위하여 농도별 혹은 투여시간에 따른 항종양 활성을 검토하였다.

<84> 【표 6】

L5178Y-ML25 임파종 세포 접종에 의해 생성된 폐암 전이에 대한 KM-100의 저해효과

처리 (100 μ g)		평균치 무게 표준편차(저해 %)	
On day	겨우살이	간(liver)	비장(spleen)
정상	-	1.07 \pm 0.02	0.09 \pm 0.02
무처리	종양 대조군	3.48 \pm 0.65	0.21 \pm 0.05
+i.d	KM-110	1.59 \pm 0.22 (78.4)**	0.14 \pm 0.02 (58.3)*

주) * P<0.05, ** P< 0.001, 대조군과 비교하였을 때(by student's two-tailed t test)

<85> 표 7의 결과에 나와 있듯이 정맥 혹은 피하주사의 어떠한 경우에 있어서도 10 μ g까지의 투여까지 그리고 종양접종 후 3일까지는 유효한 종양의 전이억제 효과를 나타내었으나 5일 후의 투여는 대조군과 유의성이 인정되지 않았다. 따라서 동물실험모델에서 KM-110의 종양전이억제 효과를 나타내는 유효농도는 10 μ g까지이며, 종양접종 후 3일 이내의 투여로서 유효한 종양전이억제 효과를 나타내었다.

<86> 【표 7】

결장 26-M3.1 세포에 의한 전이된 폐암에 대한 KM-110의 치료효과

처 리		폐암 전이(저해 %)	
분량(μ g)	경로	평균치 무게 표준편차	레인지
무처리	(종양 대조군)	127 \pm 9	116 - 139
100	피하주사	72 \pm 27 (43.3)*	40 - 100
	정맥주사	64 \pm 27 (49.6)*	37 - 90
10	피하주사	55 \pm 24 (73.0)*	37 - 88
	정맥주사	61 \pm 12 (51.9)*	52 - 75
1	피하주사	115 \pm 12	106 - 123
	정맥주사	132 \pm 25	104 - 151

주) * p<0.01, 대조군과 비교하였을 때(by Student's two-tailed t test)

<87> 실시예 12: KML-C의 종양전이 억제 효과

<88> 세포독성 효과 및 사이토카인(cytokines)의 유도 등의 시험관내(in vitro) 실험에서

KML-C는 KM-110에서 가장 중요한 활성성분의 하나로 밝혀졌기 때문에 생체내(*in vivo*) 종양전이에서 치료효과를 나타내는 KM-110의 활성성분도 KML-C인지를 확인하기 위하여 KML-C에 대한 종양전이억제 효과를 조사하였다. 도 14의 결장(colon) 26-M3.1 암(carcinoma)을 이용한 종양전이억제의 예방적 효과에 대한 실험결과에 나타냈듯이 대조군으로서 KM-110의 100 μ g 투여 결과는 80% 이상 종양의 전이를 억제하여 앞선 결과와 동일한 효과를 나타내었고, KM-AS에 의한 전이억제 효과가 KM-110의 효과와 비슷한 결과를 나타냄으로서 KM-110의 항종양효과를 나타내는 활성성분은 그 단백질 성분에 존재한다는 것을 암시하였다. 그리고 KML-C 50ng의 투여는 KM-110의 결과와 유사하게 80% 이상 종양의 전이를 억제함으로서 KML-C는 KM-110의 종양전이를 억제하는 활성성분인 결과를 나타내었다. 그러나 5ng의 투여는 종양전이의 억제효과가 인정되지 않았기 때문에 항종양 효과를 나타내는 생체내에서(*in vivo*)의 유효량은 5ng 이상인 것으로 나타났다. L5178Y-ML25 임파종(lymphoma) 및 결장(colon) 26-M3.1 암(carcinoma)에 의한 종양전이의 치료효과도 KM-110의 실험결과와 유사한 활성을 나타내어 생체내(*in vivo*) 항종양 활성을 나타내는 KM-110의 유효성분은 KML-C로 나타났다(표 8, 표 9). 결과에 나타난 바와 같이 KML-C에 의한 종양전이에 있어서 치료효과를 나타내는 유효량은 50~10ng의 범위인 것으로 사료되었다. 이러한 KML-C의 항종양 활성은 종양세포에 대한 직접적인 세포독성 효과와 더불어 종양에 대한 방어기구인 대식세포(macrophage) 및 NK-세포 등의 활성화에 의한 면역자극 효과에 의하여 유도되는 것으로 사료되었다.

【표 8】

마우스의 간(liver), 비장(spleen) 또는 폐암전이에 대한 KML-C의 치료효과(실험I; L5178Y-ML25 임파종 세포(lymphomacells))

겨우살이 처리			평균치 무게(g) 표준편차, (저해%)	
	접종일	분량	간	비장
정상적인 쥐			1.07±0.1	0.09±0.02
무처리	(종양 대조군)		3.54±0.48	0.21±0.05
	종양접종 1일 후	100μg	1.59±0.22(56.5)	0.14±0.02(33.3)*
	종양접종 1일 후	50ng	1.83±0.84(48.3)**	0.16±0.04

주) * p<0.05; **p<0.01, 종양대조군과 비교할 때(by student's two-tailed t test, compared)

<90> 【표 9】

마우스의 간(liver), 비장(spleen) 또는 폐암전이에 대한 KML-C의 치료효과(실험II; 결장(colon)26-M3.1 세포)

겨우살이 처리			폐암전이의 수(저해 %)	
	접종일	분량	평균치 표준편차	범위
무처리	종양대조군		100±3	85 ~ 17
KM-110	종양접종 1일, 2일, 3일 후	100μg	62±30(38.0)*	27 ~ 93
KM-AS	종양접종 1일, 2일, 3일 후	1.5μg	59±8(41.0)**	44 ~ 83
KML-C	종양접종 1일, 2일, 3일 후	50ng	74±23(26.0)*	41 ~ 97
KML-C	종양접종 1일, 2일, 3일 후	25ng	54±27(46.0)**	26 ~ 77
KML-C	종양접종 1일, 2일, 3일 후	10ng	61±4(39.0)**	43 ~ 76
KML-C	종양접종 1일, 2일, 3일 후	1ng	98±1	82 ~ 108

주) *p<0.05; **p<0.01, 종양 대조군과 비교할 때(by Student's two-tailed t test, compared)

<91> 실시에 13: 대식세포의 활성화에 의한 종양세포 살해능

<92> 생체의 면역감시구에서 제 1선을 담당하는 대식세포(macrophage)는 종양을 비롯하여 바이러스 감염세포, 미생물 등에 대한 방어기구로 잘 알려져 있다. 항종양 활성화와 관련하

여 대식세포(macrophage)는 여러 가지 사이토카인을 분비하거나 직접 접촉하여 종양세포를 살해하며 종양세포에 대한 이후의 면역방어 기작을 유도하게 된다. 따라서 KM-110 및 KML-C에 의한 *in vivo* 항종양 활성을 조사하고자, KM-110 혹은 KML-C를 주사한 마우스의 대식세포와 종양세포에 대한 직접적인 살해기전을 가지는지 조사하였다. 마우스(B16-BL/6)에 100 μ g의 KM-110 또는 50ng의 KML-C를 복강주사하고, 2일 및 4일 후에 대식세포(effector cell)를 RPMI-1640 배지를 이용하여 멸균적으로 수집하고 종양살해능을 측정하였다. 실험에 사용된 목표종양세포(target tumor cell)인 B16-B16 흑색종(melanoma)은 방사선 동위원소인 ^{51}Cr 으로 표지하였고, 1x10⁴/웰(well)의 세포밀도로 96-웰 배양 플레이트(96-well culture plate)의 각 웰(well)에 첨가한 후, KM-110 혹은 KML-C가 주사된 마우스의 대식세포를 회수하여 1x10⁵/웰(well) 및 5x10⁴/웰(well)의 세포밀도로 조정하여 B16-B16 흑색종(melanoma)이 미리 들어있는 각 웰(well)에 첨가 후 12시간 동안 동시 배양하였다. 대조군으로는 KM-110이 처리되지 않은 정상 마우스의 대식세포를 이용하였다. 배양종료 후, 시료에 의한 대식세포(macrophage)의 활성화를 종양세포 살해효과로 측정하였고, 다음 식에 의하여 계산하였다.

$$\text{<93> 살해활성(\%)} = \frac{[\text{실험적 유리(expreimental release)} - \text{자연적 유리(spontaneous release)}]}{\text{최대유리(maximum release)} - \text{자연적 유리(spontaneous release)}} \times 100$$

$$\text{<94>}$$

<95> 도 15의 A에서 보듯이, KM-110을 주사한 마우스의 대식세포(macrophage)는 KM-110을 주사하지 않은 정상 마우스의 대식세포(macrophage)에 비하여 B16-BL6 흑색종(melanoma) 종양세포주의 증식을 유의하게 억제하는 활성을 나타내었으며, 이 활성은 KM-110주사 2일에 최고를 나타내었고, 4일째부터는 감소하는 현상을 나타내었다. 따라서, KM-110의

투여는 생체내에서(*in vivo*) 종양세포에 대항하는 대식세포(macrophage)를 활성화시키는 작용을 하는 것으로 사료되었다. 이 결과에 근거하여 KML-C에 의한 효과는 투여 2일째에 조사하였다. 도 15의 B의 결과에 있듯이 KML-C 투여 2일 후의 대식세포(macrophage)는 ^{51}Cr 으로 표지된 B16-BL6 흑색종(melanoma)의 살해능을 유효하게 증진시키는 활성이 있었다. 이 결과로 종양세포에 대한 살해기전을 가지는 대식세포(macrophage)를 활성화시키는 KM-110의 성분 역시 KML-C가 주된 활성을 가지는 것으로 사료되어 졌다. 이러한 대식세포(macrophage)의 종양 살해능은 자극에 의하여 활성화된 대식세포(macrophage)가 유도하는 $\text{TNF-}\alpha$ 또는 종양세포와의 직접 접촉에 의하여 일어나는 것으로 알려져 있다. 또, 활성화된 대식세포(macrophage)는 종양세포를 살해하는 활성산소(ROIs) 및 일산화질소(NO) 등도 분비하는 것으로 알려져 있기에 KM-110 혹은 KML-C에 의한 종양세포의 살해능은 이들 종양세포 살해물질의 유도와도 관련이 있을 것으로 사료되었다.

<96> 실시예 14: NK-세포에 의한 종양전이억제 기전

<97> 여러 연구에서 NK-세포는 종양의 성장 및 전이를 억제한다는 것은 이미 증명되어 있으며 KM-110 및 KML-C를 투여한 마우스의 비장세포가 YAC-1 세포를 살해하는 NK-세포의 활성을 증진시키는 효과가 있다는 것은 시험관내(*in vitro*) 실험에서 이미 확인하였다(실시예 9). 시험관내(*in vitro*)에서 KM-110 또는 KML-C에 의한 NK-세포 활성화는 시료투여 1-3일째에 정점에 도달하였으며 이것은 생체내에서(*in vivo*) 시험물질에 의한 종양전이 치료 효과가 종양의 접종 3일 이내에 본 발명물을 처리하였을 때 유효한 종양전이의 억제효과를 나타낸 것과 일치하는 경향을 나타내었다. 따라서 KM-110에 의한 항종양 전이 효과가 NK-세포의 활성화에 기인되는 현상인지를

*in vivo*에서 유도되는지에 대한 증명이 요구되기에 실험동물에 anti-asialo-GM1 항체를 미리 주사하여 NK-세포가 제거된 마우스를 이용하여 결장(colon) 26-M3.1 폐암(lung carcinoma)의 전이에 미치는 KM-110의 효과를 조사하였다. 도 16의 결과에서 보듯이 생체내에서(*in vivo*) anti-asialo-GM1 항체를 미리 처리한 마우스의 경우, 정상마우스에 비하여 전이된 종양의 수가 2배 이상 증가한 결과를 나타내어 anti-asialo-GM1 항체에 의한 NK-세포의 불활성화가 생체내에서(*in vivo*) 유도되었음을 입증하였다. 정상 마우스에서 종양의 접종 2일전에 KM-110을 처리한 경우는 도 13의 결과와 비슷한 약 80% 이상의 종양전이억제 효과를 나타내었으나 NK-세포가 제거된 마우스의 경우 KM-110의 처리에도 불구하고 대조군과 비슷한 수준의 종양전이가 유도됨으로, 정상마우스에서 유도되는 KM-110에 의한 종양전이억제 효과가 없어지는 결과를 나타내었다. 따라서 KM-110에 의한 종양전이억제 효과는 종양세포에 대한 NK-세포의 활성화가 직접 관여되는 것으로 증명되었다. KML-C의 경우도 생체내에서(*in vivo*) 유도한 비장세포(splenocytes)가 종양세포에 대한 NK-세포 활성이 증진된 결과를 나타낸 바 KM-110과 동일한 기전에 의한 항종양 전이 활성이 일어나는 것으로 사료된다.

<98> 실시예 15: 생체내(*In vivo*) 실험모델에서 종양의존성 혈관신생의 억제

- <99> 종양의존성 혈관신생(tumor-induced angiogenesis)은 고형암(solid tumor)의 성장 뿐 아니라 전이성 종양의 원발소(primary tumor) 및 전이 부위(metastatic sites)로의 이동 및 성장에 있어서 필수적으로 일어나는 현상으로 알려져 있다. 실험동물 전이모델에서 KM-110은 종양의 전이를 억제하는 항종양 활성을 나타내었기에 그의 기전을 조사하기 위한 하나의 방법으로서 KM-110에 의한 종양의존성 혈관신생의 억제 효과를 조사하였다.

표 10에 나타나 있듯이 종양접종 1일 후에 100 μ g의 KM-110 투여(i.v.)는 종양의존성 혈관신생을 유효하게 억제(43.9%)하였으며 동시에 종양의 성장을 대조군에 비하여 유의하게 억제하였다.

<100> 【표 10】

생체내에서 종양의존성 혈관신생의 형성과 종양성장에 대한 KM-110의 저해효과			
처리	종양주사날짜	원발소의 크기	종양유도 혈관의 수
무처리		7.0 \pm 0.6	9.8 \pm 1.1
KM-110	종양접종 1일 후	5.4 \pm 0.4**	5.5 \pm 1.3**
	종양접종 3일 후	5.3 \pm 0.6*	6.7 \pm 1.2*
	종양접종 5일 후	6.0 \pm 1.0	8.3 \pm 2.5
주) * p<0.05, ** p<0.01, 대조군과 비교할때(by Student's two-tailed t test)			

<101> KM-110의 종양의존성 혈관신생 억제 효과는 종양의 이식 3일까지 유효하였고, KM-110 10 μ g의 투여까지도 유사한 결과를 나타내었다. KM-110에 의한 혈관신생 억제효과와 실험동물 전이모델에서의 종양전이 억제효과를 연관시켜보면, 두 경우에 있어서 KM-110의 투여량 및 투여시기는 각각 100 ~ 10 μ g 및 종양의 이식 3일째까지로 유효한 종양의존성 혈관신생 억제효과를 나타냄으로서 항종양 활성을 나타내는 KM-110의 유효량 및 투여시기가 일치하는 결과를 나타냈다. KM-110의 종양의존성 혈관신생 및 종양증식 억제 효과를 좀더 자세히 검토하기 위하여 종양이식 3일 후에 KM-110(100 μ g, i.v.)을 투여 후, 매일 혈관신생 및 종양의 증식을 대조군과 비교하면서 검토한 결과 KM-110은 혈관신생 및 종양의 증식을 종양이식 8일째까지 유효하게 억제한 결과를 나타냄으로서 KM-110의 혈관신생 및 종양의 증식 억제 효과를 확인할 수 있었다(도 17). 이 결과는 종양의 치료 목적으로 KM-110의 연투를 실시할 경우, 5일 간격의 투여는 실험동물 모델에서 항종양전이 효과가 유도될 수 있다는 것을 암시하였다.

<102> 실시에 16: 자연폐암전이(Spontaneous lung metastasis) 모델에서 KM-110 및 KML-C의 종양전이 억제 효과

<103> KM-110의 1차 종양(primary tumor)의 증식 및 전이에 미치는 치료효과의 검토는 B16-BL6 흑색종(melanoma) 세포주를 이용한 자연전이모델을 이용하였다(표 11). 결과에 나타난 바와 같이 종양을 이식한 담암숙주(tumor-bearing mice)의 경우에서 1차 종양을 제거하기 전에 KM-110($100\mu\text{g}/\text{mouse}$)의 3일 간격으로의 5회 투여는 1차 종양의 증식 및 종양의 전이를 유효하게 억제하였으며, 1차 종양을 제거 후, 동일한 시간 간격으로 총 5회 투여의 경우에서도 유효한 종양전이 억제 효과를 나타내었다. 그리고 1차 종양의 제거 전 후의 총 10회의 투여경우에서도 유효한 종양의 증식 및 전이억제 효과를 나타내었기에 종양에 대한 KM-110의 치료효과를 확인할 수 있었다. 종양의 자연전이 모델에서 KM-110의 종양에 대한 치료효과는 KM-110의 종양세포에 대한 직접적인 세포독성 효과 및 대식세포(macrophages)로부터의 사이토카인(cytokines)의 유도과 그에 의한 종양의존성-혈관신생의 억제효과를 포함하여, 종양에 대항하는 시토틱 대식세포(cytolytic macrophages), NK-세포 및 종양세포에 대한 세포독성 T-세포(CTL)의 활성화 등 종양에 대한 숙주의 면역능이 증진되어 나타나는 결과로 사료되었다. 그러나 50ng의 KML-C를 투여 할 경우에는 종양의 원발소(primary tumor)는 대조군에 의하여 유효하게 증식이 억제되었으나 전이암의 경우에는 유효한 결과를 나타내지 못했다. 따라서 겨우살이를 종양의 치료 목적으로 사용할 경우 렉틴(lectin) 성분인 KML-C는 KM-110에서 가장 중요한 활성성분으로 인식되지만 KM-110 만큼의 성적을 나타내지 못하는 경향을 보였기에 헤파린 결합단백질(heparin binding protein) 등의 다른 성분에 의한 복합적인 활성이 필요

할 것으로 사료되었다.

<104> 【표 11】

자연전이모델에서 B16-BL6 흑색종 세포에 의해 생성된 폐암전이에 대한 KM10의 다중 투여 치료효과		종양 크기(mm) (평균치 ± 표준편차)	폐암전이(저해 %)	
샘플	1차 종양 제거 후 투여 날짜		평균치 ± 표준편차	범 위
실험 I				
	종양 대조구	12.0 ± 1.4	54 ± 2	32-66
KM-110	5일, 8일, 11일, 14일, 17일	9.0 ± 0.9**	27 ± 8 (50.0)**	18-35
KML-C	5일, 8일, 11일, 14일, 17일	8.9 ± 0.9**	50 ± 8	30-64
실험 II				
	종양 대조구	11.8 ± 0.9	72 ± 8	29-125
KM-110	5~17일, 22~34일	8.9 ± 1.0**	34 ± 8 (52.8)*	13-55
주) * P< 0.05, ** P<0.001, 대할 때(by Student's two-tailed t test)				

<105> 실시예 17: KM-110 및 KML-C의 KLH에 대한 항체유도의 증진효과

<106> 외래물질인 항원이 숙주에 들어오면 숙주는 항원에 대항하기 위하여 항원특이적인 면역 반응을 유도하며 이 면역반응은 크게 두 가지 즉, 체액성 및 세포성 면역계가 작동하게 된다. 본 실험에서는 KM-110 및 KML-C의 면역증강 효과를 주로 B-세포의 항체생산과 관련된 체액성 면역계에 미치는 효과를 조사하였다. 본 실험을 위한 항원으로 KLH를 사용하였고, KM-110 혹은 KML-C의 면역증강 효과를 조사하기 위하여 항원 단독 혹은 KM-110 및 KML-C를 각각 동시투여 한 후, KLH에 특이적인 항체의 유도능을 간접(indirect) ELISA로 조사하였다. ELISA 플레이트(plate)에 KLH를 코팅(coating)하고 BSA로 각 웰(well)을 블라킹(blocking)한 후 PBS-tween(0.05%)으로 3회 세척하였다. 준비한 KLH에 대한 항혈청을 20배부터 희석시켜

각 웰(well)에 첨가하고 2시간 동안 37℃의 조건에서 반응시켰다. PBS-tween으로 세척 후 마우스 면역글로블린에 페록시다제(peroxidase)가 결합(conjugation)된 2차 항체 (peroxidase-conjugated goat anti mouse IgG+A+M; Zymed Lab. INC. USA)를 넣고 2시간 반응 후, ABTS 기질용액(0.2mM의 2, 2-azino-di-(3-ethylbenzothiazoline-6-sulfonic acid) diammonium salt, Kirkegaard and Perry Laboratory, Inc., Gaithersburg, MD)을 첨가하고 414nm에서 흡광도(O.D)값을 측정하였다. KLH에 대한 항체의 역가는 정상 마우스의 혈청에 대한 흡광도 값의 2배가 되는 희석비로 결정하였으며, KM-110 및 KML-C에 의하여 역가가 증가된 항체의 이소타입(isotype)의 결정은 마우스 면역글로부린의 각 이소타입(isotype)에 대한 특이적인 2차항체(peroxidase-conjugated goat anti mouse IgG, A 혹은 M; Zymed Lab. INC. USA)를 이용한 ELISA로 조사하였다.

<107> 도 18의 결과에 나타나 있듯이, 1회의 면역만으로도 100 μ g의 KM-110 또는 20ng의 KML-C를 KLH 항원에 혼합하여 면역한 경우 항원 단독의 경우에 비하여 유의한 항체역가 상승 효과가 인정되었다. 1회 면역 2주 후에 추가 항원 자극 증강법(booster) 면역을 한 혈청의 역가는 항원단독 투여군과 비교하여 10 μ g의 KM-110의 동시투여는 32배, 100 μ g의 KM-110 동시투여는 1000배 이상 높은 결과를 나타냈다. 또한, KML-C(20ng)를 동시투여한 결과도 유사한 반응을 보여 추가 항원 자극 증강법(booster) 주사의 경우는 60배 이상의 항체역가 상승이 인정되었다. KM-110 또는 KML-C를 KLH와 동시에 면역한 경우에 있어서 추가 항원 자극 증강법(booster)주사를 실시한 경우, 항체역가의 상승효과는 항원 투여 10주 쯤까

지 유의성이 인정되는 보조액(adjuvant) 효과가 있는 것으로 나타났다. 따라서 KM-110의 구성물질인 KML-C는 항종양활성을 가지는 물질일 뿐 아니라 면역증강 효과를 나타내는 주요한 활성성분임이 확인되었다. 그리고 증진된 항체의 서브이소타입(subisotype)을 아강-특이 이차 항체(subclass-specific second antibody)를 이용하여 조사한 결과 주로 IgG1 및 IgG2a 및 IgG2b 형(type)이 증가된 결과를 나타내었다(도 19). 따라서 KM-110 및 KML-C는 항체생산과 관련된 헬퍼 T세포(helper T(Th)cell)의 기능을 조절하는 기능이 있는 것으로 사료되었고, 주로 IgG1 형(type)만을 생산하는 알루미늄 성분(alum component)을 대체할 수 있는 활성이 있는 것으로 사료된다.

<108> 실시예 18: 항원 특이적인 림프구의 활성화

활성화

<109> KM-110 및 KML-C에 의한 T-세포 매개의 세포성 면역 응답을 조사하기 위하여 시험관내에서(*in vitro*) KLH 항원에 대하여 미리 감작된 림프구(lymphocytes)의 분화 에세이(proliferation assay)를 실시하였다. 상기 실시예 17에서 마우스에 KLH를 단독 혹은 KM-110 및 KML-C 보조액(adjuvant)을 각각 혼합하여 피하주사로 2회 면역하여 항체의 역가가 가장 높게 상승한 5주째에 마우스로부터 비장을 적출한 다음 시험관내에서(

in vitro)에서 KLH를 넣고 3일간 재자극하였다. 도 20의 결과에 나타나 있듯이 KM-110 혹은 KML-C를 동시에 주사한 마우스 그룹(group)의 비장세포는 KLH 단독 주사한 마우스의 비장세포에 비하여 항원으로 사용한 KLH에 대하여 유효한 세포의 분화(proliferation) 활성을 나타내었으며, 이 활성은 시험관내에서(*in vitro*) 재자극하는 KLH의 농도에 의존하는 경향을 나타내었다. 이 결과로서 KM-110 및 KML-C는 항원 KLH에 대응하는 T-세포의 면역응답능을 증가시키는 활성이 있어 실시예 17의 결과를 지지해 주었다. 따라서 KM-110 혹은 KML-C는 종양 및 바이러스 감염에 대해서 효과적인 방어를 위한 항원특이적인 세포성 면역능을 유도하게 하는 백신(vaccine)에 대한 보조액-- (adjuvant)으로서의 응용 가능성이 있을 것으로 사료되었다.

<110> 실시예 19: 항원 특이적인 사이토카인의 유도

<111> KLH 항원에 대한 보조액(adjuvant)으로서의 KM-110 혹은 KML-C의 효과는 T 헬퍼 세포 서브유닛(T helper cell subunits)로부터 분비되는 사이토카인(cytokine)에 의한 것으로 사료되었기에, KLH에 감작된 마우스의 비장세포 배양상등액을 이용하여 체액성 면역 기구를 조절하는 Th-세포의 Th1 및 Th2 세브셋(subsets)유래의 사이토카인(cytokines)인 IL-2 및 IL-4의 유도 여부를 ELISA 키트(Kit)를 이용하여 조사하였다(도 21). 결과에 나타난 바와 같이 대조군인 PBS를 투여한 마우스의 경우, 두 사이토카인(cytokines)의 경우 모두에서 검출한계 이하의 사이토카인(cytokine)활성을 나타내었으나 항원 KLH에 보조액(adjuvant)으로서 KM-110 혹은 KML-C를 동시에 면역한 경우는 KLH 단독의 경우에 비하여 IL-2 및 IL-4 등 2가지 형(type)의 사이토카인(cytokine) 모두 2배 이상 증가된 사이토카인(cytokine) 유도활성을 나타내어 항원 KLH에 대한 세포성 및 체액성 면역반응

의 증가를 유도하는 활성이 있는 결과를 나타내었다.

<112> 실시예 20: 지연성과민반응의 증진효과

<113> 지연성과민반응(delayed type hypersensitivity; 이하 DTH)은 주로 항원에 의하여 활성화되어진 T-세포가 여러 가지 사이토카인(cytokines)을 유도하게 되고, 이로 인하여 대식세포(macrophage) 등의 비특이적 염증세포들이 항원이 침입한 부위에 침윤되어 항원에 대항함으로서 숙주에 침입한 항원을 불활성화시키는 작용으로 알려져 있다. KM-110 및 KML-C의 세포성 면역반응에 미치는 효과를 생체내에서(*in vivo*) 지연성과민반응을 이용하여 조사하였다. 지연성과민반응 측정은 항원으로 미리 감작시킨 마우스의 풋패드(footpad)에 항원을 s.c.로 주사 후 유도되는 풋패드 종기(footpad swelling)를 조사하였다. 도 22의 결과에 나타나 있듯이 KM-110 및 KML-C를 항원 KLH와 함께 면역한 마우스는 항원 단독 면역된 마우스에 비하여 풋패드 종기(footpad swelling)가 증가되는 결과를 나타내었다. 이 결과로서 KM-110 및 KML-C는 항원 KLH에 대한 T-세포의 분화활성(proliferating activity)과 같은 세포성 면역능을 증진시키는 효과가 있는 것으로 사료되었다.

<114> 실시예 21: KM-110에 의한 CTL활성유도의 상승

<115> 항종양 활성과 관련하여 KM-110의 세포독성 T-세포(CTL)의 활성화에 미치는 효과를 검토하였다. CTL 활성의 측정을 위하여 C57BL/6(H-2^b) 마우스에 X-선을 조사하여 불활성화된 P815(H-2^d) 비만세포종(mastocytoma) 세포주를 단독 혹은 KM-110과 혼합하여 2주 간격으로 2회 면역하였다. 최종면역 2주 후 마우스로부터 비장세포를

취하고 항원으로 사용한 P815 세포주를 첨가 후 6시간 동안 배양하였다. 이때 P815 세포는 미리 ^{51}Cr -표지(labelled)된 세포를 이용하였다. 비장세포의 CTL 활성은 배양 종료 후 살해된 P815 세포가 유리한 방사선 동위원소의 양을 측정하였고 다음 식에 의하여 그 활성을 구하였다.

$$\text{CTL 활성(\%)} = \frac{[^{51}\text{Cr} \text{ 실험적 유리(experimental release)} - ^{51}\text{Cr} \text{ 자연적 유리(spontaneous release)}]}{[^{51}\text{Cr} \text{ 최대유리(maximum release)} - ^{51}\text{Cr} \text{ 자연적 유리(spontaneous release)}]} \times 100$$

$$\text{CTL 활성(\%)} = \frac{[^{51}\text{Cr} \text{ 실험적 유리(experimental release)} - ^{51}\text{Cr} \text{ 자연적 유리(spontaneous release)}]}{[^{51}\text{Cr} \text{ 최대유리(maximum release)} - ^{51}\text{Cr} \text{ 자연적 유리(spontaneous release)}]} \times 100$$

<118> 도 23의 결과에서 볼 수 있듯이, 종양항원이 면역된 마우스의 비장세포는 대조군인 항원 무처리 마우스의 경우에 비하여 타겟(target) 세포인 P815의 살해효과가 2%에서 약 38%로 증가된 결과를 나타냄으로서 이중 종양항원에 대한 비장세포의 살해 효과가 증진된 결과를 나타내었다. 동일한 조건에서 $100\mu\text{g}$ 의 KM-110을 동시에 투여한 마우스의 비장세포는 P815의 살해효과가 78% 정도 나타내어 항원만을 투여한 경우에 비하여 약 2배 이상 증가된 활성을 나타내었고, 그 살해 효과는 비장세포의 농도(E/T ratio)에 비례하였다. 종양항원에 대하여 특이적인 살해효과를 가지는 비장세포는 주로 CTL(cytotoxic T-lymphocyte)에 의한 것으로 사료되는 바, KM-110에 의한 비장세포의 종양세포 살해효과는 종양세포 특이적인 세포성 면역반응에 의하여 유도된 것으로 사료되었다. 따라서 KM-110은 주로 체액성 면역능만을 증진시키는 알루미늄 성분(alum component)의 단점을 극복할 수 있는 보조액(adjuvant)으로의 가능성을 충분히 제시하였다.

<119> 실시예 22: 종양백신에 대한 보조액 활성화

<120> KM-110은 세포성 면역능뿐 아니라, B-세포와 관련된 체액성 면역능을 증진시키는 보조액(adjuvant)활성이 있었고, 이 결과는 종양의 예방 혹은 치료에 있어서 종양백신에 대한 보조액(adjuvant)으로서의 활성이 있을 수 있다는 가능성을 제시하였다. 따라서 B16-BL6 세포주에 의해 수행되는 실험종양 전이모델에서 X-선 조사로 불활성화된 종양백신과 보조액(adjuvant)으로서 KM-110을 혼합하여 투여시켰을 경우 종양의 전이를 유효하게 억제하는 효과가 있는지에 대한 실험을 실시하였다. 표 10의 실험 I의 결과에 나타냈듯이 종양접종 7일 전의 KM-110 혹은 종양백신 각각의 단독투여는 종양 대조군과 비교하여 전이된 종양의 감소가 나타나지 않았으나, KM-110과 종양백신을 병용 투여한 마우스 그룹(group)은 대조군에 비하여 57.4%의 종양전이 억제효과를 나타내었다. 표 12의 실험 II의 결과는 종양의 접종 5일 및 10일 후의 총 2회씩 시료를 투여한 결과를 나타내었다. 총 2회의 종양백신 단독투여 결과는 대조군과 비교하여 동일한 종양의 전이를 나타내었으며, KM-110 단독의 경우 일부 억제효과가 있었으나 대조군과의 통계적 유의성은 없었다. 그러나 KM-110 보조액(adjuvant)과 종양백신의 병용투여는 44.6%의 종양전이 억제효과가 나타났다. 종양에 대한 항원특이적인 면역반응이 유도되기 위해서는 종양세포 특이적인 항원성 분자를 면역담당세포가 인식하여야 한다. 여러 가지 종양세포에 있어서 종양 특이적 항원이 표현되어 있다는 것은 여러 보고에서 인정되어 있으며, 주로 활성화된 T-세포가 이들 항원성 종양세포를 인식, 파괴시키는 것으로 알려져 있다. 또한 종양에 대한 체액성 면역작용으로서 종양에 대하여 숙주는 종양에 대한 항체를 유도하는 것으로 보고되고 있다. 그러나, 종양의 증식억제와 관련된 항체의 작용에 대한 여러 연구

보고는 연구자에 따라 그 결과가 일치하지 않아 종양에 대한 체액성 면역작용은 여러 논란이 있음에도 불구하고 숙주에서 분리한 종양을 불활성시켜 면역자극물질들과 혼합하여 숙주에 재투여함으로써 종양특이적인 면역능을 유도하여 종양을 억제하려는 시도도 행하여져 유의성 있는 결과를 얻었다. 표 12의 실험 I 및 실험 II에 나타난 KM-110의 종양 전이 억제 효과는 KM-110의 보조액(adjuvant)효과에 의한 종양백신의 항원 특이적인 면역반응의 유도로서 종양세포 특이적인 CTL 및 종양에 대한 항체의 직접적인 살해효과를 포함하여, 활성화된 대식세포(macrophage) 및 NK-세포의 항체의존성 세포살해효과 (antibody dependent cellular cytotoxicity; ADCC)등 복합적인 작용에 기인하는 것으로 생각되어 진다.

<121> 【표 12】

B16-BL6 흑색종 백신에 대한 KM-100의 보조액 효과				
면역처리 프로토콜			폐암전이의 수	
처리 날짜	KM-110	종양-백신	평균치 ± 표준편차 (저해 %)	레인지
실험 I (치료 효과)				
종양대조구			235 ± 29	(206 - 273)
종양접종 7일전	-	+	234 ± 31	(210 - 278)
종양접종 7일전	+	-	216 ± 23	(181 - 231)
종양접종 7일전	+	+	100 ± 47 (57.4)**	(39 - 141)
실험 II (치료 효과)				
종양대조구			121 ± 21	(91 - 143)
종양접종 5일과 10일 후	-	+	123 ± 63	(57 - 210)
종양접종 5일과 10일 후	+	-	95 ± 28 (21.5)	(72 - 130)
종양접종 5일과 10일 후	+	+	67 ± 36 (44.6)*	(27 - 109)

주) * p<0.05, **P<0.01, 대조군과 비교할 때

<122> 실시에 23: 종양세포 특이적인 비장세포의 활성화

<123> 체내에서 항원에 대하여 감작된 T-세포는 동일한 항원에 의한 2차 자극에 의해 활성화

되어 체액성 및 세포성 면역반응을 급속히 유도하게 되며, 이때 면역증강물질은 이상의 면역반응을 증진시키는 역할을 하게 된다. 표 12의 결과에서 KM-110은 종양백신에 대한 보조액(adjuvant) 활성 결과를 나타내었기 때문에, 종양백신과 KM-110을 각각 단독으로 또는 동시에 마우스에 면역한 후, 마우스의 림프구를 시험관에서(*in vitro*) 항원인 종양백신으로 재자극(restimulation)하여 유도되는 림프구의 항원에 대한 반응성을 조사하였다. 도 24의 결과에서, 림프구를 시험관(*in vitro*)에서 항원으로 재자극한 결과, 항원 단독처리구 면역에 비하여 KM-110을 항원과 동시에 면역한 마우스의 림프구가 항원에 대해 유의적으로 높은 반응성을 나타냈고, 그 반응성은 항원과 반응하는 비장세포의 농도(S/R ratio)에 의존적이었다. 또한 림프구의 종양백신에 대한 활성화는 자극원인 종양백신 농도에 의존적인 경향을 나타내었으며 종양백신만 투여한 마우스의 림프구는 정상마우스에 비하여 유효한 림프구의 활성화를 나타내지 않았다. 이 결과로 KM-110은 종양백신만으로는 잘 유도되지 않는 면역반응을 증진시키는 보조액(adjuvant)활성이 있는 것으로 사료되었으므로, 표 12의 KM-110에 의한 종양전이의 특이적인 억제효과는 KM-110의 종양항원 특이적인 면역기능의 활성화에 의한 결과로 생각되었다.

<124> 실시예 24: KML-C에 대한 단일클론 항체의 생산 및 특성 조사

<125> KML-C에 대한 단일클론 항체의 생산을 위해서 Balb/c 마우스에 PBS에 용해된 300ng/100 μ l의 KML-C에 동량의 완전한 프로인트보조액(complete Freund's adjuvant)을 유화시켜 복강에 면역시켰다. 14일 후에 동량의 항원을 불안정한 프로인트보조액(incomplete Freund's adjuvant)에 유화시켜 1회 더 면역시켰다. 최종 면역 10일 후에 면역한 마우스로부터 소량의 혈액을 채취하여 혈청을 얻은 후, 항원을 고정시키는 indirect ELISA로

항체의 역가를 확인 후, 항원(300ng)만으로 복강 내에 추가 항원 자극 증강법 주사 (booster injection)를 하였다. 최종면역 1주일 후에 KML-C를 면역한 Balb/c마우스의 비장세포와 P3U1 골수종을 PEG를 이용하여 융합한 후, HAT배지로 하이브리도마(hybridoma)를 선별한 후, KML-C에 대한 항체를 생산하는 하이브리도마(hybridoma) 세포를 ELISA로 선택하고 96 웰 플레이트(well plate)에서 웰(well)당 1개의 하이브리도마(hybridoma)가 되도록 분주(cloning)하고 콜로니(colony)를 형성하며 성장할 때까지 배양하였다. 콜로니(colony)를 형성하며 성장한 하이브리도마(hybridoma)의 배양상등액을 ELISA로 측정하여 KML-C에 대한 항체를 생산하는 하이브리도마(hybridoma)를 선별(screening)하였으며, 이러한 클로닝(cloning)과 스크리닝(screening)을 2회 더 반복하여 KML-C에 대한 단일클론 항체를 생산하는 하이브리도마(hybridoma)세포를 선택하였다. 항체를 대량 생산 하기 위하여 프리스탄(pristane)을 주입한 마우스의 복강에 하이브리도마(hybridoma)세포를 주사하여 복수종 액체(ascitic fluid)를 얻었으며, 항체의 정제를 위하여 복수종 액체(ascitic fluid)를 단백질-G 친화칼럼(protein-G affinity column, Phamacia사)에 적용하여 항체를 분리하였다. 정제된 단일클론항체 중에서 KML-C와 특이적으로 반응하는 항체와 유럽산의 렉틴성분의 EML-1과 교차반응하는 항체를 선별하기 위하여 ELISA를 실시하였다. 먼저, KML-C 혹은 EML-1을 ELISA 플레이트(plate) 각 웰(well)에 2 μ g/mL의 농도로 코팅(coating)시키고 BSA를 이용 블라킹(blocking)시킨 후, 양성반응을 나타내는 하이브리도마(hybridoma)의 복수를 넣고 반응 후, 발색을 위하여 HRP가 결합(conjugation)된 2차 항체를 첨가하였다. 그후 기질로서 TMB(Sigma사)를 이용하여 발색 후, 450nm에서 흡광도를 측정하였다. 도 25에 나타난 바와 같이 ELISA에 의한 항체의 특이성 실험결과, 9H7-D10은 KML-C 특이적으로 반응하는 항체로 판명되었고, 8B11-2C5의 경우는 KML-C 및

EML-1과 높은 교차 반응성을 나타내었다. ELISA에 의한 교차반응의 실험결과, 각 항체의 항체 역가를 ELISA에서 흡광도(O.D)값이 NSB(non-specific binding)보다 현저히 높은 흡광도값, 즉 0.5이상을 나타내는 복수의 희석치로 나타낼 때, 9H7-D10과 8B11-2C5 항체는 각각 5만 및 10만 이상의 높은 항체 역가를 나타냈다. 그외에 KML-C에 대하여 양성반응을 나타내는 항체는 8E12-3E9 등 여러종류가 있었다. 이들 생산된 항체의 서브타입(subtype)을 결정한 결과 9H7-D10 및 8B11-2C5는 IgG1형이었고 8E12-3E9는 IgM형이었다. 이들 3가지 항체를 이후 렉틴의 분리 및 분획을 위한 실험에 적용키로 하였다.

<126> 실시예 25: 면역-친화성 컬럼(Immuno-affinity column) 준비 및 KML-IIU, KML-II L의 분리

<127> ELISA에 의한 항체의 특성조사 결과 9H7-D10 항체는 EML-1과의 교차반응 없이 KML-C와 특이적으로 반응하는 결과를 얻었기에, 신속하고 정제된 KML-C로부터 두개의 렉틴 성분의 분리를 위하여 9H7-D10항체를 제조회사의 프로토콜에 따라 HiTrp NHS 활성 친화 컬럼(activated affinity column, Pharmacia Boitech사)에 고정시킨 면역-친화성 컬럼(immuno-affinity column)을 제조하였다. 우선 평형버퍼(PBS, pH 7.4)로 컬럼을 평형시키고 KML-C를 컬럼(column)에 통과시키고 PBS로 용출되는 분획과 용출버퍼(elution buffer)인 pH2.7의 글라이신-염산 완충용액(glycine-HCl buffer)에 의하여 용출되는 분획을 수집하였다. 컬럼(column)을 통과하는 버퍼의 용출속도는 1mL/2분으로 실시하였다. 각 용출물질의 순도 및 분자량 결정은 10% SDS-폴리아크릴아미드(SDS-polyacrylamide) 전기영동으로 조사하였으며 대조군으로는 KML-C 및 EML-1을 사용하였다. 도 26의 결과에 나타낸 바와 같이 9H7-D10 항체가 고정된 면역-친화성 컬럼을 이용하여 KML-C로부터 두

개의 분획을 분리할 수 있었다. 실시예 2에서 전기영동한 결과에 따라 그 중 분자량이 큰 분획을 KML-IIU, 작은 분획을 KML-II L로 명명하였다. 머캡토에탄올(mecaptoethanol)이 함유된 환원상태에서 KML-IIU와 KML-II L은 각각 서로 다른 분자량을 가지는 두 개의 체인(chain)이 이황화물(disulfide)이 결합한 헤테로다이머(heterodimer)형태로 구성됨을 확인하였다. 즉, KML-IIU는 33.2KD와 28.6KD의 분자량을 가지는 단백질 밴드로 구성되는 61.8KD의 성분이고, KML-II L은 31KD 및 25.5KD의 단백질로 구성되는 56.4KD의 물질로 확인되었다. 이들 구성 단백질은 기 발표된 유럽산 겨우살이의 3가지 렉틴(lectin) 성분(ML-I, -II, -III)의 구성 단백질과 분자량에서 명백한 차이를 나타냈다.

<128> 실시예 26: KML-IIU, KML-II L의 당특이성 조사

<129> KML-L로부터 분리된 두 개의 단백질 분획이 렉틴(lectin) 활성을 가지는지; 그리고 렉틴(lectin) 활성이 있다면 어떠한 당에 특이성을 가지는지에 대한 조사를 적혈구 응집반응과 당에 의한 응집반응 저해 실험을 실시하였다. 응집반응과 저해반응 조사는 U-형 96 웰 플레이트(U-type 96 well plate)에서 조사하였다. 플레이트(plate)의 각 웰(well)에 PBS에서 2%로 조정된 B형 적혈구를 넣은 후, 여러 농도로 조정된 단백질 분획을 첨가하고 상온에서 1시간 배양 후 응집반응을 나타내는 단백질 분획의 최소농도를 구하였다(표 13). 결과에 나타난 바와 같이 한국산 겨우살이로부터 분리된 KML-C 및 그의 KML-IIU와 KML-II L은 8 μ g/mL의 농도까지 적혈구 응집반응을 나타냈기에 렉틴(lectin)물질로 확인되었고, 이들 렉틴(lectin)의 당 특이성을 조사하기 위하여 응집반응을 나타내는 농도에서 여러 종류의 당을 100mM

부터 단계적으로 희석하여 첨가해 당에 의한 적혈구 응집반응의 저해효과를 조사하였다(표 14). 실험결과 KML-C, KML-IIU 및 KML-IIL 모두 락토오스(lactose), 갈락토오스(galactose), N-아세틸갈락토오스아민(N-acetylgalactoseamine)에 의해서 응집반응이 저해되는 결과를 보였다. 한편 유럽산의 EML-1은 기 발표된 바와 같이 락토오스(lactose)와 갈락토오스(galactose)에 의하여 응집반응이 저해되었다. 그리고 한국산 및 유럽산의 렉틴(lectin) 모두 락토오스(lactose)를 구성하는 글루코스(glucose)에 의해서는 응집반응 저해효과가 유도되지 않았기 때문에, 본 발명에서 분리된 한국산 겨우살이 렉틴(lectin)들은 갈락토오스(galactose)와 N-아세틸갈락토오스아민(N-acetylgalactoseamine)에 특이성을 가지는 렉틴(lectin)으로 확인되었다.

<130> 【표 13】

KML-IIU 및 KML-IIL의 적혈구 응집반응 활성	
렉틴	최소 농도($\mu\text{g/mL}$)
KML-C	8
KML-IIU	8
KML-IIL	8
EML-1	2

<131> 【표 14】

KML-IIU and KML-IIL의 적혈구응집반응(haemagglutinating) 활성을 저해하기 위한 여러 다당류의 최소농도	
당 류	최소농도(mM)
갈락토오스	6
락토오스	3
N-아세틸갈락토오스아민	3
만노오스	>100
글루코스	>100
N-아세틸글루코스아민	>100

<132> 실시예 27: KML-IIU, KML-II L과 유럽산 렉틴의 아미노산 서열 비교

<133> 분리된 두 개의 렉틴, KML-IIU 및 KML-II L과 유럽산 렉틴(EML-1)과의 상이성을 조사하기 위하여 N-말단 아미노산 염기서열 분석(N-terminal amino acid sequencing)을 실시하였다. 환원 상태의 SDS-PAGE에서 분리된 KML-IIU의 A 및 B 체인(chain)을 85mA의 조건으로 70분간 PVDF(polyvinylidene difluoride) 멤브레인(membrane)에 전사(electroblotting)시켰다. 전사된 단백질을 110℃에서 24시간 동안 6M의 염산으로 가수분해(hydrolysis)한 후, Effendorf/Biotronic LC 3000 아미노산 분석기(amino acid analyzer)에 적용하여 KML-IIU 각 체인(chain)들의 아미노산 서열(amino acid sequence)을 조사하였으며, 이와 같은 방법으로 KML-II L의 아미노산 서열을 조사하여 유럽산 렉틴과 아미노산 서열(amino acid sequences)을 비교한 결과는 표 15에 나타내었다. 각각의 체인(chain)의 표시는 전기영동 상에서는 분자량이 작아서 아래에 있는 밴드를 A-체인(A-chain), 분자량이 커서 위에 있는 밴드를 B-체인(B-chain)으로 명명하였다. 표 15에서 N-말단 30번까지의 KML-IIU A-체인(chain)의 분석 결과, N-말단으로부터 30번까지의 아미노산 서열(amino acid sequences)은 5, 15, 16, 19, 27, 28번의 잔기 등 6개의 아미노산 외에 24개의 아미노산은 동일한 배열을 하고 있는 것으로 나타나 15% 정도의 상이성을 나타내었다. EML-I, -II 및 -III의 N-말단 30번까지의 아미노산 서열(amino acid sequences)은 동일한 것으로 보고되었고 EML-II 및 -III의 경우 EML-I에 비하여 약간 적은 분자량을 가지며, 당 특이성이 다른 이소폼(isoform)으로도 구분된다는 것을 고려하면, KML-IIU의 경우 A-체인(A-chain)에서 N-말단 30번까지 유럽산의 EML-I 뿐 아니라 EML-II 및 -III등의 렉틴류 전체와는 다른 구조를 가지고 있는 물질로 사료되었다. B-체

인(B-chain)의 분석 결과 KML-IIU의 경우 비교하기 어려웠지만 KML-II L의 경우는 서로 상이한 아미노산 서열(amino acid sequence)을 가지는 결과를 나타냈다.

<134> 【표 15】

KML-IIU 및 KML-II L, EML-1의 체인들에 대한 아미노산 서열					
렉틴	체인(분자량)	아미노산 서열			
		1	10	20	30
KML-IIU	A(30KDa)	YEREK LRVTH QTTGD QYFKF ITLLA DQHS			
KML-II L	A(27.5KDa)	YERER LRVTH QTTGE EYFRF ITLLA DTV			
EML-1	A(29KDa)	YERER LRVTH QTTGE EYFRF ITLLA DTVSS			
		1	10	20	30
KML-IIU	B(32.5KDa)	미확인			
KML-II L	B(31KDa)	DVTXT ASEPT VRI			
EML-1	B(34KDa)	DDVTS SASEP TVRIV GRNGM			

<135> 실시예 28: KML-IIU 및 KML-II L의 암세포에 대한 세포독성 실험

<136> 분리한 한국산 겨우살이 렉틴의 활성조사로서 우선 유럽산 겨우살이

렉틴(EML-1)을 대조군으로 하여 다양한 세포주에 대한 세포독성 효과를 시험관내에서() 관찰하였다. 먼저 각각의 세포주 일정량을 96 웰 플레이트(well plate)에 넣고 다양한 농도의 렉틴을 첨가하고 48시간 후에 XTT법에 의한 세포의 성장을 조사하여 각 종양세포 주의 성장을 50% 억제한 시료의 농도(ED₅₀)를 표 16에 표시하였다. 그 결과 KML-IIU는 B16-BL6 흑색종(melanoma), Meth A 섬유육종(fibrosacoma) 세포주에 비교적 높은 저항성을 나타낸 반면, 3LL 암(carcinoma), Raji 임파종(lymphoma)은 비교적 높은 감수성을 나타내어 종양세포에 대한 일부 특이성이 있는 것으로 사료되었다. 또한 대부분의 종양세포에 있어서 KML-IIU의 세포독성 효과는 유럽산 렉틴보다 강한 것으로 나타났으며 세포주에 따라서는 10배 이상 높은 세포독성 효과를 나타내었다. 결장(colon)26-M3.1 암(carcinoma), B16-BL6 흑색종(melanoma) 및 L1210 백혈병(leukemia) 세포주에서 KML-IIU 및 KML-II L의 세포독성 효과를 비교한 결과 모든 경우에서 KML-II L이 비교적 높은 세포독성 효과를 나타내었다.

<137> 【표 16】

한국산과 유럽산 셀 라인	겨우살이 기 원	렉틴의 살해효과 비교 종양세포주의 성장을 50% 억제한 시료의 농도(ED ₅₀)(/mL)			
		KML-C	KML-IIU	KML-II L	EML-1
결장26-M3.1	암종	5ng	40ng	1.1ng	8.1ng
B16-BL6	흑색종	15ng	140ng	21ng	320ng
L1210	백혈병	1.5ng	20.1ng	1.5ng	1.5ng
Jurkat	백혈병	110pg	2.0ng	90pg	2.0ng
HL60	백혈병	-	50.5ng	1.0ng	21.0ng
Meth A	섬유육종	-	210ng	-	1200ng
3LL	암종	-	80ng	-	30ng

<138> 실시예 29: 단일클론 항체의 각 렉틴과의 반응성 및 세포독성 중화효과

<139> 준비된 단일클론항체 중에서 KML-C와 EML-1에 대하여 높은 반응성을 나타낸 9H7-D10, 8B11-2C5 항체를 이용한 sandwich ELISA로서 각 렉틴(lectin)과 단일클론 항체의 교차반응을 조사하였다. 각 렉틴(lectin)과 교차반응을 가지며 IgM 타입인 8E12-3E9 항체를 코팅(coating)하고, 여러 농도로 희석된 KML-IIU, KML-IIL 및 EML-1을 각각 반응시켰다. 그 후 과요오드산염(periodate)법으로 9H7-D10과 8B11-2C5 항체에 HRP가 결합(conjugation)된 접합체(conjugate)를 첨가하여 각 렉틴(lectin)과 단일클론 항체와의 반응성을 조사하였다. 도 27의 결과에 나타난 바와 같이 9H7-D10 항체는 KML-IIL 및 EML-1과의 교차반응 없이 KML-IIU에 특이적인 반응을 보였다. 한편 8B11-2C5 항체는 KML-IIU, KML-IIL 및 EML-1의 모든 렉틴과 교차반응을 나타냈다. 이 결과를 근거로 하여 각 단일클론 항체에 의한 각 렉틴(lectin) 성분의 세포독성 중화효과를 조사하였다(도 28). 도 28에 나타난 바와 같이, 9H7-D10 항체는 KML-IIU에 대해서만 세포독성 중화효과가 나타난 반면, 8B11-2C5 항체는 KML-IIU, KML-IIL 및 EML-1의 세포독성을 중화하는 활성이 있었다. 이 결과로서 한국산의 KML-IIU는 KML-IIL 및 유럽산의 EML-1과는 항원결정기(epitope)를 달리하는 서로 다른 구조를 가지는 물질임이 명백해 졌다. 한편, 8B11-2C5 항체는 한국산 및 유럽산의 모든 렉틴(lectin)과 교차반응을 나타냈다. 따라서 한국산 및 유럽산 렉틴(lectin)은 또한 서로 같거나 상당히 유사한 항원 결정기를 동시에 함유하는 것으로 생각되었다. 특히, KML-IIL과 EML-1은 단일클론 항체에 의한 반응성이 상당히 유사한 결과를 보였지만 EML-1과는 당 특이성 및 B-체인(B-chain)의 아미노산 서열(amino acid sequence)에서 상이성이 있기에 다른 성질을 가지는 렉틴(lectin)으로 사료되었다.

<140> 실시예 30: KML-IIU 및 KML-IIL의 대식세포로부터 사이토카인의 유도

<141> KML-C로부터 분리된 두 가지 렉틴(lectin)성분인 KML-IIU와 KML-IIL의 사이토카인(cytokine)유도능을 EML-1의 유도능과 비교하여 조사하였다. 실험 방법은 실시예 6과 동일한 방법인 ELISA법으로 조사하였다. 대식세포(macrophage)를 자극한 각 렉틴(lectin)의 농도는 50ng/mL이었고, 그 결과는 도 29에 나타내었다. 실험결과 KML-IIU 및 KML-IIL은 쥐의 대식세포(mouse macrophage)를 직접 자극하여 IL-1, IL-6, TNF- α 를 유도하였으나 IFN- γ 의 유도능은 없는 결과를 나타냈다. 두 렉틴(lectin)간의 사이토카인(cytokine) 유도 활성은 각 사이토카인(cytokine)에 따라 약간의 차이가 있었으나 모두 유럽산인 EML-1의 경우에 비하여 높은 활성을 보임으로서 앞에서의 결과인 생화학적 차이 외에도 활성적 면에서의 차이도 있는 결과를 나타냈다.

<142> 실시예 31: KML-IIU 및 KML-IIL의 종양전이 억제 효과

<143> 세포독성과 사이토카인(cytokine)의 유도 활성에 근거하여 두 렉틴(lectin)간의 생체내에서(*in vivo*) 종양전이 억제 활성을 조사하였다. 실험에 적용한 종양세포주는 결장(colon)26-M3.1 폐암(lung carcinoma)이었고, 종양접종 2일전에 i.v.로 시료를 투여하였고, 그 결과는 도 30에 제시하였다. 마우스에 투여한 각 렉틴(lectin)의 양은 마우스 당 100~1ng이었으며, 결과 KML-IIU와 EML-1은 100~50ng사이에서 유사한 항종양 전이활성을 보였다. KML-IIL의 경우는 KML-IIU 및 EML-1에 비하여 10정도 적은 농도에서 활성을 나타내 마우스에서 항종양 효과를 나타내는 적정농도는 50 ~ 5ng으로 사료되었다. 이 결과에서 KML-C로부터 분리한 두 렉틴(lectin)인 KML-IIU 및 KML-IIL에 의한 생체내에서

(*in vivo*) 항종양 활성은 KML-ⅡL의 경우가 KML-ⅡU보다 10배정도 높은 활성을 가지는 것으로 해석되었다.

<144> 실시예 32: KML-ⅡU 및 KML-ⅡL의 HBV에 대한 항체 생산능

<145> KM-110, KML-ⅡU, KML-ⅡL의 면역증강 작용을 비교실험하였다. 실험에 적용한 항원은 B형 간염 바이러스(hepatitis B virus, 이하 HBV)에서 병원성을 나타내는 pre-S2부분을 이용하였다. 그룹(Group)당 5마리의 마우스에 s.c.로 2주 간격으로 총 2회 면역하고 15주 쯤까지 마우스로부터 혈청을 분리하여 항체의 역가를 조사하였다. 대조군으로는 20%의 알루미늄 히드록시드 보조액(aluminium hydroxide adjuvant)을 사용하였다. 항체의 역가를 조사하기 위한 ELISA법은 5 μ g/mL의 항원을 코팅(coating)하고 여러 농도로 희석된 항혈청을 반응시켰다. 항원과 반응한 항체의 역가를 측정하기 위하여 HRP가 결합(conjugation)된 마우스에 대한 2차 항체(rabbit-anti-mouse-IgG+A+M-HRP; X8000, Zymed)를 구입하여 사용하였다. 효소반응을 위한 기질은 TMB(Sigma)를 사용하였고, 450nm에서 흡광도(O.D값)를 측정하였다. 항체의 역가는 정상마우스가 나타내는 흡광도값의 3배가되는 흡광도 값을 나타내는 혈청의 희석비로 구하였다. 실험결과, 도 31에 나타난 바와 같이 첫 번째

면역 1주일의 결과에서 KM-110 혹은 각 렉틴 보조액(lectin adjuvant)의 항체 역가는 대조군인 알루미늄 히드록시드 보조액(aluminium hydroxide adjuvant)을 사용한 경우보다 높은 결과를 나타냈다. 일반적으로 알루미늄(alum) 계열의 보조액(adjuvant)은 빠른 면역응답을 나타내는 것으로 알려져 있는데 KM-110 및 각 렉틴(lectin)은 알루미늄(alum) 계열의 보조액 보다도 높은 초기면역반응을 유도하였다. 추가 항원 자극 증강법(booster) 면역 후, 2주 후에는 알루미늄(alum) 계열의 보조액과 KM-110 및 KML-IIU의 경우 비슷한 항체 역가를 보였으나, KML-IIL 군은 이들에 비하여 2배 이상 높은 항체 역가를 나타냄으로 KML-IIL이 항체 생산에 있어서 가장 높은 활성을 가지는 결과를 얻었다. 항체생산 지속성 면에서도 본 발명의 보조액(adjuvant)은 알루미늄(alum) 계열의 보조액과 비교하여 유사한 경향을 나타냈고 최초면역 15주 때까지 항원 특이적인 항체생산능을 유도하는 것으로 나타났다. 항체생산성에 미치는 보조액(adjuvant) 활성 역시 항종양전이 활성(실시에 35)과 동일하게 KML-IIL가 KML-IIU보다 우수한 것으로 나타났다.

<146> 실시에 33: 한국산 겨우살이 렉틴 유전자의 부분 클로닝

<147> 정제된 KML-IIU, KML-IIL의 아미노산 서열을 기초로 하여 2개의 올리고뉴클레오타이드 프라이머(oligonucleotide primer)를 디자인하였다(프라이머 1 :5'-GTIACICATCAIACIGG-3', 프라이머 2 :5'-ACIATICGC ACIGTIGGTTC-3'). 이 두개의 프라이머를 이용하여 한국산 겨우살이의 전체 게놈 DNA(genomic DNA)로부터 중합효소 연쇄반응(Polymerase Chain Reaction, PCR)을 실시하였다. CTAB방법으로 추출된 게

놈 DNA 1 μ g, 각각의 프라이머(primer) 100pmol, 각각 200 μ M의 dNTP, 1.5mM의 MgCl₂, Amplitaq(Perkin-Elmer사) DNA 폴리머라제(polymerase) 2.5units로 조성된 PCR 반응액을 Thermal cycler(Perkin-Elmer 9600)로 PCR을 수행하였다 『94℃에서 1분간 변성(denaturation), 45℃에서 2분간 어닐링(annealing), 72℃ 2분간 프라이머 확장(primer extention), 35회 반복』. PCR 반응결과 획득한 약 800bp의 DNA를 pGEM-T 벡터(Promega사)의 *EcoRV*에 연결시켜 클로닝하였다. 재조합 플라스미드 벡터의 모식도는 도 32와 같다.

<148> 실시예 34: 한국산 겨우살이 렉틴유전자의 부분염기서열과 아미노산 서열

<149> 클로닝된 렉틴(lectin) 유전자의 클론 중 2개를 DNA 염기서열을 자동 염기서열 분석기(automated sequencer)를 이용하여 결정하였으며 실험결과, 도 33에 KML-IIU 유전자 염기서열을 나타냈고 도 34에 KML-II L의 유전자 염기서열을 각각 나타냈다. 종래 식물의 렉틴(lectin)들은 대개 여러가지 이소폼(isoform)이 함께 존재하는 것으로 많이 보고되어 있는데 한국산 겨우살이의 경우에도 염기서열 분석(sequencing)결과 클론간에 염기서열의 다소간의 차이를 보여 여러 이소폼(isoform)이 존재할 가능성이 시사되었다. 또한 DNA 염기서열로부터 아미노산 서열을 추론(도 33, 도 34)하여 기존에 알려진 유럽산 겨우살이 렉틴(lectin) 및 연관된 다른 식물의 렉틴(lectin)의 서열을 비교하여 표 17a 내지 17d에 나타냈다. 표 17a 내지 17d에서 IIU는 정제된 KML-IIU의 아미노산서열, IIL은 정제된

KML-II의 아미노산서열, C1은 PCR 증폭산물 클론 1번의 DNA서열로부터 추론된 아미노산서열, C2는 PCR 증폭산물 클론 2번의 DNA서열로부터 추론된 아미노산서열, EMLA는 유럽산 겨우살이(European mistletoe) 렉틴(lectin) I A-체인 아미노산서열, EMLB는 유럽산 겨우살이(European mistletoe) 렉틴(lectin) I A-체인 아미노산서열, RTA는 리신 독소(rincin toxin) A-체인의 아미노산서열, RTB는 리신 독소(rincin toxin) B-체인의 아미노산서열, ABA는 아브린(abrin) A-체인의 아미노산서열, ABB는 아브린(abrin) B-체인의 아미노산서열을 나타낸다.

<150> 【표 17a】

한국산 겨우살이 렉틴, 유럽산 겨우살이 렉틴 그리고 다른 연관된 렉틴의 서열비교.

< A 체인 >																										
II U				Y	E	R	L	K	L	Y	-	V	T	H												
II L				Y	E	R	L	R	L	R	-	V	T	H	Q	T	T	G	D	E	Y	F	R	F	I	T
C1															H	Q	T	T	G	D	E	Y	F	R	F	I
EMLA				Y	E	R	L	R	L	R	-	V	T	H	Q	T	T	G	E	E	Y	F	R	F	I	T
RTA	I	F	P	K	Q	Y	P	I	I	N	F	T	T	A	G	A	T	V	Q	S	Y	T	N	F	I	R
ABA				E	D	R	P	I	-	K	F	S	T	E	G	A	T	S	Q	S	Y	K	Q	F	I	E
II U																										
II L	Y	V																								
C1	Y	V	S	S	G	S	F	S	N		E	I	P	L	L	R	Q	S	T	I	P	V	S	D	A	
EMLA	Y	V	S	S	G	S	F	S	N		E	I	P	L	L	R	Q	S	T	I	P	V	S	D	A	
RTA	R	L	T	T	G	A	D	V	R	H	E	I	P	V	L	P	N	R	V	G	L	P	-	I	N	
ABA	R	L	R	G	G	L	-	-	I	H	D	I	P	V	L	P	D	P	T	T	L	Q	-	E	R	
C1	V	E	L	T	N	Q	G	G	D	-	S	I	T	A	A	I	D	V	T	N	L	Y	V	V	A	
EMLA	V	E	L	T	N	Q	G	Q	D	-	S	V	T	T	A	I	D	V	T	N	A	Y	V	V	A	
RTA	V	E	L	S	N	H	A	-	E	L	S	V	T	L	A	L	D	V	T	N	A	Y	V	V	G	
ABA	V	E	L	S	N	S	D	T	E	-	S	I	E	V	G	I	D	V	T	N	A	Y	V	V	A	
C1	Q	S	Y	F	L	R	-	D	A	P	D	G	A	E	-	-	R	H	L	F	T	G	T	T	R	
EMLA	Q	S	Y	F	L	R	-	D	A	P	R	G	A	E	-	-	T	H	L	F	T	G	T	T	R	
RTA	S	A	Y	F	F	H	P	D	N	Q	E	D	A	E	A	I	T	H	L	F	T	-	-	-	D	
ABA	Q	S	Y	F	L	R		D	A	P	S	S	A	S	D	Y	-	-	L	F	T	G	T	-	D	
C1	S	S	L	P	F	T	G	S	Y	T	D	-	L	E	R	Y	A	G	H	-	-	R	D	Q		
EMLA	S	S	L	P	F	N	G	S	Y	P	D	-	L	E	R	Y	A	G	H	-	-	R	D	Q		
RTA	Y	F	T	A	F	G	G	N	Y	-	D	R	L	E	Q	L	A	G	-	N	L	R	E	N		
ABA	-	S	L	P	F	Y	G	T	Y	G	D	-	L	E	R	W	A	-	H	Q	S	R	Q	Q		

<151> 【표 17b】

한국산 겨우살이 렉틴, 유럽산 겨우살이 렉틴 그리고 다른 연관된 렉틴의 서열비교.

<A 체인>																																
C1	-	I	E	E	L	I	Q	S	V	S	A	L	-	-	R	Y	P	G	G	-	-	-	S	T	R	A	Q	A	R	S		
EMLA	-	I	D	Q	L	I	Q	S	V	T	A	L	-	-	R	F	P	G	G	-	-	-	S	T	R	T	Q	A	R	S		
RTA	P	L	E	E	A	I	-	-	-	S	A	L	Y	Y	Y	S	Y	G	G	T	Q	L	P	T	L	-	-	A	R	S		
ABA	A	L	T	H	G	T	-	-	-	S	F	F	-	-	R	S	-	G	G	N	D	N	E	E	K	-	-	A	R	T		
C2											A	R	F	N	P	I	X	W	R	L	R	R	Q	-	I	N	S	G	E	S		
C1	L	I	I	L	I	Q	M	I	S	E	A	A	R	F	N	P	I	F	W	R	-	A	R	Q	Y	I	N	S	G	E	S	
EMLA	I	L	I	L	I	Q	M	I	S	E	A	A	R	F	N	P	I	L	W	R	-	Y	R	Q	Y	I	N	S	G	A	S	
RTA	F	I	I	C	I	Q	M	I	S	E	A	A	R	F	Q	Y	I	E	G	E	-	M	R	T	R	I	R	Y	N	R	R	
ABA	L	I	V	I	I	Q	M	V	A	E	A	A	R	F	R	Y	I	S	N	R	-	V	R	V	S	I	Q	T	G	T	A	
C2	S	S	P	P	N	Y	M	L	E	L	E	T	S	W	G	R	Q	S	T	Q	V	Q	Q	S	K	-	D	G	I	F		
C1	F	L	P	D	M	Y	M	L	E	L	E	T	S	W	G	Q	Q	S	T	Q	V	Q	Q	S	T	-	D	G	V	F		
EMLA	F	L	P	D	V	Y	M	L	E	L	E	T	S	W	G	Q	Q	S	T	Q	V	Q	H	S	T	-	D	G	V	F		
RTA	S	A	P	D	P	S	V	I	T	L	E	N	S	W	G	R	L	S	T	A	I	Q	E	S	N	Q	G	A	-	F		
ABA	F	Q	P	D	A	A	M	I	S	L	E	N	N	W	D	N	L	S	R	G	V	Q	E	S	V	Q	D	T	-	F		
C2	N	T	Q	I	R	L	-	Q	I	S	A	G	N	F	-	V	-	T	S	X	N	V	R	D	V	-	I	-	-	S		
C1	N	N	P	F	R	L	-	G	I	S	T	G	N	F	-	V	-	T	L	S	N	V	R	D	V	-	I	-	-	A		
EMLA	N	N	P	I	R	L	-	A	I	P	P	G	N	F	-	V	-	T	L	T	N	V	R	D	V	-	I	-	-	A		
RTA	-	-	-	-	-	A	S	P	I	Q	L	Q	R	R	-	N	G	S	K	F	S	V	Y	D	V	S	I	L	I	P		
ABA	P	N	Q	V	T	L	T	N	I	R	N	E	P	V	I	V	D	S	L	S	H	P	T	-	V	-	-	-	-	A		
C2	S	L	A	I	M	L	F	E	C	S	G	R	P	F	S	S																
C1	S	L	A	I	M	L	F	V	C	R	D	R	P	S	S	S																
EMLA	S	L	A	I	M	L	F	V	C	G	E	R	P	S	S	S																
RTA	I	I	A	L	M	V	Y	R	C	A	P	P	P	S	S	Q	F															
ABA	V	L	A	L	M	L	F	V	C	N	P	P	P	P	N																	

<152> 【표 17c】

한국산 겨우살이 렉틴, 유럽산 겨우살이 렉틴 그리고 다른 연관된 렉틴의 서열비교.

<링커>																														
C2				L	D	H	P	S	P	L	L	L	R	S	V	V	D	A	A	N										
C1				D	V	R	Y	W	P	L	V	I	R	P	V	L	E	N	S	G	A	V								
EMLA																														
RTA								S	-	L	L	I	R	P	V	V	P	N	F	N										
ABA				A	N	Q	S	P	L	L	I	R	S																	

<153> 【표 17d】

한국산 겨우살이 렉틴, 유럽산 겨우살이 렉틴 그리고 다른 연관된 렉틴의 서열비교.

< B 체인 >																					
II L		D	V	T	X	T	A	S	E	P	T	V	R	I							
C2		D	V	T	C	T	X	S	E	P	T	V	R	I	V						
C1	D	D	V	T	C	T	A	S	E	P	T	V	R	I	V						
EMLB	D	D	V	T	S	S	A	S	E	P	T	V	R	I	V	G	R	N	G	M	
RTB	A	D	V	C	M	D	P	-	E	P	I	V	R	I	V	G	R	N	G	M	
ABB	S	K	I	C	S	S	R	Y	E	P	T	V	R	I	G	G	R	D	G	M	

<154> 실시예 35: 겨우살이를 함유하는 복합 보조액(adjuvant)의 면역증강 효과

<155> 본 실험은 이미 사용되고 있는 보조액(adjuvant)에 KM-110을 혼합하여 새로운 보조액 처리방안(adjuvant formulation)을 구하고자 실시하였다. 실험결과 KM-110에 의한 시너지 활성(synergistic activity)이 유도된다면 다양한 형태의 보조액(adjuvant)으로서의 개발가능성을 시사한다고 사료된다. 일반적으로 보조액(adjuvant)은 여러 항원에 대하여 활성을 나타내어야 하기에 본 실험에서는 가축에서 폐렴을 유도하는 원인균 중의 하나인 마이코플라스마(mycoplasma)를 사용하였다. 항체 역가의 조사는 실시예 32과 동일한 방법으로 하였고 실험결과는 도 35에 나타냈다. 실험에 사용한 기존의 보조액(adjuvant)은 20%의 알루미늄 히드록시드(aluminum hydroxide)와 3%의 오일(oil)인 ASA25를 사용하였다. 실험결과 KM-110과 알루미늄 보조액(alum adjuvant)으로는 실시예 32의 결과와 유사한 형태로 유효한 항체생산 증진효과가 인정되었으나 오일(oil)만으로는 면역은 KM-110과 알루미늄(alum)에 비하여는 비교적 낮은 항체생산성을 유도하였다. 추가 항원 자극 증강법(booster) 면역 2주 후의 결과에서 기존의 보조액(adjuvant)인 알루미늄(alum) 보조액과 ASA25를 혼합하여 면역시킨 결과는 각 보조액(adjuvant) 단독 면역의 경우에 비

하여 약 5배정도 높은 역가를 나타내는 항체가 유도됨으로서 기존의 보조액(adjuvant)을 혼합한 경우, 단독 면역방법의 결과에 비하여 우수한 상승효과가 나타났다. 이 경우에서 KM-110이 혼합한 결과 보조액(adjuvant) 단독 면역의 경우에 비하여 약 10배 정도의 높은 역가를 가지는 항체가 생산되었다. 따라서 KM-110을 기존의 보조액(adjuvant)에 혼합한 경우에서도 KM-110은 높은 역가를 나타내는 항체를 생산하는 활성이 있기에 KM-110이 포함되는 새로운 형태의 보조액(adjuvant)이 개발될 수 있는 가능성을 제시하였다.

<156> 실시예 36: 숙주를 달리하는 겨우살이 추출물의 각 렉틴 함량

<157> 상기 실시예들의 결과에서 KM-110이 가지는 항종양 혹은 면역증강효과는 주로 렉틴분획에 의하는 것으로 나타났으므로 조추출물(crude extracts)인 KM-110의 활성을 나타내는 지표물질로서의 렉틴함량을 측정하는 방법의 개발은 중요한 의미

를 가진다고 할 수 있으므로 본 실시예에서는 KML-IIU에 단일클론 항체 특이성을 나타내는 9H7-D10과 KML-IIU 및 KML-II L에 대하여 교차반응을 나타내는 특성이 있었던 8B112C5, 두 항체를 이용하여 한국산 겨우살이 추출물에서 KML-C의 함량 및 KML-IIU의 함량을 측정할 수 있는 면역분석법(Sandwich법 ELISA)을 개발하였다. 각 렉틴(lectin)의 함량을 측정하기 위하여 9H7D10 및 8B112C5 항체에 HRP를 Lamini법에 의하여 결합(conjugation)시켰다. Sandwich법 ELISA를 위한 코팅(coating) Ab로는 IgM 타입(type)인 8E12-3E9(X1,000)을 이용하였고, BSA를 이용하여 블라킹(blocking)한 후에 각 렉틴(lectin)을 순차적으로 희석하여 반응시켰다. 반응 완료 후 HRP가 결합(conjugation)된 9H7D10 및 8B112C5 항체를 넣어 각각의 렉틴(lectin)과 반응시키고 TMB용액을 첨가하여 발색시켰다. Sandwich ELISA에 의한 KML-C와 KML-IIU의 표준 곡선(standard curve)을 작성 검출 범위를 조사한 결과 각각 $2.5\mu\text{g}\sim 30\text{ng/mL}$, $5\mu\text{g}\sim 80\text{ng/mL}$ 이었다(도 36). 도 36의 표준 곡선(standard curve)에 총 6개의 숙주나무로부터의 겨우살이 렉틴(lectin)함량을 측정한 결과는 표 18에 나타냈다.

<158> 【표 18】

여러 종류의 숙주나무로부터 겨우살이 추출물내 렉틴과 총 단백질 함량

숙주나무	양	단백질(μg)	KML-C(μg)	KML-IIU(μg)
참나무(<i>Quercus</i>)	200mg	1864	64.8 \pm 8.6	33.8 \pm 2.5
밤나무(<i>Castanea</i>)	200mg	1471	459.7 \pm 22.4	235.4 \pm 12.5
모과나무(<i>Chaenomeles</i>)	200mg	1755	112.9 \pm 10.7	55.8 \pm 5.5
살구나무(<i>Prunus</i>)	200mg	1258	710.2 \pm 31.7	429.7 \pm 36.5
가죽나무(<i>Ailanthus</i>)	200mg	935	88.8 \pm 8.2	47.2 \pm 3.8
돌배나무(<i>Pyrus</i>)	200mg	748	94.5 \pm 7.3	52.9 \pm 5.2

<159> 표 18에 나타난 바와 같이 단백질의 함량을 조사한 결과 숙주에 따라 서로 상이한 결과

가 나타났다. 숙주에 따라 각 겨우살이의 단백질 총량은 200mg의 겨우살이에서 748~1864의 함량을 나타냄으로 0.374%~0.932%를 차지하는 결과를 나타내어 숙주별에 따른 명백한 함량의 차이를 보였다. KML-C 함량을 ELISA로 분석한 결과 참나무 겨우살이의 경우 KML-C 함량은 총 단백질량 중 3.6%를 나타낸 반면, 살구나무의 경우는 50%의 높은 KML-C 함량을 나타내어 총 단백질로부터 KML-C의 함량은 참나무에 비하여 21배 이상 높은 비율로 함유되어 있었다. 그리고 밤나무의 경우도 약 30%를 함유하여 비교적 높은 비율의 KML-C을 함유하였으며, 모과, 가죽, 들배나무 겨우살이의 경우는 각각 5.6, 8.2, 12.7%이었다. 그리고, KML-C에서 KML-IIU가 차지하는 비율은 실험에 사용했던 6개의 숙주를 달리하는 겨우살이 추출물내의 KML-C 중에서 53.7±3.9%의 비율을 함유하여 KML-C에서 KML-IIU가 차지하는 비율은 약 54% 정도임을 알 수 있었다. 현재까지 겨우살이의 면역관련 활성에 의한 항암효과는 주로 KML-C 성분으로 밝혀졌기에 한국산 겨우살이 추출물의 면역증강 작용은 숙주나무에 따르는 활성의 차이가 명백할 것으로 사료된다. 이 결과는 또한 실시예 7에서의 헤파린 결합 단백질(heparin binding protein) KMHP 등의 기타 활성물질의 함량차이가 날 수 있는 가능성도 있어 숙주별에 따라 활성의 차이가 있다는 가능성을 제시하였다.

<160> 실시예 37: 숙주를 달리하는 겨우살이 추출물의 시험관내(*in vitro*) 세포독성 효과 측정

<161> 여러 가지 종양세포에 대하여 숙주를 달리하는 겨우살이 추출물들의 세포독성 효과를 시험관내에서(*in vitro*) 실시하였다. 각 겨우살이 추출물의 시험관내에서(*in vitro*)의 항암효과는 종양세포의 성장을 50%억제하는 각 시료의 농도(IC₅₀)로 표시하였다. 표 19

에 나타낸 바와 같이 각 숙주별 겨우살이 추출물은 여러 가지 세포들에 대하여 각기 다른 감수성을 나타내었다. 이 감수성의 차이는 각 겨우살이 추출물의 렉틴(lectin)함량과 비례하는 결과를 나타냈다. YAC-1세포주에 대한 세포독성 효과를 예를 들어 설명하면, 참나무 200ng, 밤나무 30ng, 모과나무 150ng, 살구나무 5.6ng, 가죽나무 90ng, 들배나무 60ng/mL의 단백질 농도에서 IC₅₀값이 결정되어 렉틴 검정(lectin assay) 결과 렉틴(lectin)함량이 가장 높은 살구나무의 세포독성이 가장 높은 결과를 보였다. 앞으로 각 숙주별 겨우살이 추출물의 면역증강 효과에 대한 자세한 연구가 필요할 것이나, 그 활성이 주로 렉틴(lectin)성분인 KML-C에 의한 것으로 조사되었다.

<162> 【표 19】

여러 숙주 나무에서 숙주나무 셀 라인	여러 종양세포라인까지 겨우살이 추출물의 살해효과 종양세포의 성장을 50% 억제하는 각 시료의 농도(IC ₅₀)(ng/mL)					
	참나무	밤나무	모과나무	살구나무	가죽나무	들배나무
YAC-1	2100	400	1600	90	1800	1600
RAW	2500	1600	1700	590	2200	2600
Molt-4	1400	500	1000	140	1000	1000

<163> 실시예 38: KMHP 및 렉틴 분획의 조합물(KM)에 의한 면역자극효과

<164> 실시예 6에서 KML-C 렉틴분획이 TNF- α , IL-1 및 IL-6 등의 사이토카인 유도능은 5ng ~ 100ng/mL 사이에서 유효한 것으로 나타났다. 그리고 KMHP의 IFN- γ 의 유도능은 1 ~ 5 μ g/mL에서 유효한 것으로 나타났다. 이 결과를 근거로하여 KMHP 2 μ g과 KML-C 20ng을 1mL의 PBS에 혼합(이하 KM으로 칭함) 후, 실시예 6과 동일한 방법에 의한 정상세포 마우스 비장의 임파구에서 사이토카인 유도능을 조사하였다. 실험결과는 표 20에 나타났다.

실험결과 KM 분획은 실험에 사용한 4개의 사이토카인 $TNF-\alpha$, IL-1, IFN- γ 및 IL-6을 모두 유효하게 유도하였다.

<165> 【표 20】

KM 분획에 의한 사이토카인의 유도능					
사이토카인 시료	IL-1	$TNF-\alpha$	IFN- γ	IL-6	세포독성 IC ₅₀ :ng/mL
KML-C(20ng)	172 ± 25	311 ± 26	0	313 ± 15	2.5 ± 0.3
KM-AS(2 μ g)	169 ± 12	220 ± 31	162 ± 20	220 ± 22	30 ± 5
KMHBP-100(2 μ g)	0	25 ± 4	356 ± 42	156 ± 22	1560 ± 62
KM(2 μ g)	195 ± 21	256 ± 31	292 ± 21	286 ± 35	225 ± 13

<166> 그러나 KM 분획은 정상세포에 대한 세포독성이 KM-AS분획에 비하여 7배 정도 낮은 결과를 나타냈다. 이 결과가 나타내는 것은 KM 분획은 렉틴으로는 유도되지 않는 IFN- γ 의 유도능을 KMHBP 분획이 보완한 것으로 사이토카인의 유도능 측면에서는 조분획물인 KM-110 혹은 KM-AS의 유사한 활성을 나타냈다. 그러나 KM-AS는 정상세포에 대한 직접적인 세포독성 효과를 7배 이상 낮추는 결과를 야기함으로써 안전성 측면에서 KM-AS 혹은 KM-110을 개선한 분획으로 인정되었다.

<167> 실시에 39: KM 분획의 *in vivo* 독성

<168> KM 분획의 생체내 급성독성 효과를 실시에 8과 동일한 방법으로 측정하였고 표 21에 나타냈다. 대조군으로는 KM-110내의 단백질 분획인 KM-AS를 사용하였다. 표 21의 결과에서 보듯이 KM-AS의 LD₅₀ 값은 100 ~ 150 μ g/마우스였으나 KM 분획의 경우는 750 μ g/마우스 정도에서 LD₅₀ 값이 나타나는 결과를 보였다. 이 현상을 좀더 자세히 고찰하면 마우스당 KM 분획을 1000 μ g 투여한 결과 6시간 이내에 급사한 경우는 없었으며 과다한 염증 사이토카인의 유도에 기인하는 것으로 추정되는 발열반응에 의한 입모 및 무기력증이 관찰되

다가 72시간 이내에 모두 폐사하였다. 그리고 LD₅₀ 값에 가까운 750 μ g/kg이 투여군에서 생존한 마우스의 경우 투여 5일까지도 입모 및 무기력 현상이 관찰되었으며 그 이후에 회복하였다. 그러나 KM-110 분획의 폐사현상은 KM 분획과는 다르게 150 μ g/kg의 고농도에 서는 투여 후 즉시 무기력증상을 보이다 24시간 이내에 폐사하였고 모두 생존한 100 μ g/kg 투여군의 경우 1 ~ 3일 까지 약간의 무기력증 및 입모현상이 관찰되다 그 이후 정상으로 돌아왔다. 이 결과에서 KM-110의 단백질 분획인 KM-AS에는 마우스에 치명적인 독성 효과를 나타내는 물질이 존재하는 것으로 생각되었다. 그러나 헤파린 컬럼으로 분리된 KMHBP-100 및 KML-C로 구성되는 KM 분획의 경우 급사현상은 관찰되지 않는 것으로 보아 헤파린 컬럼으로의 분리에 의해 이 물질은 제거되는 것으로 사료되었다.

<169> 【표 21】

KM 분획의 시료	정맥투여에 용량	날짜/생존율(%)							결과 (%)
		1일	2일	3일	4일	5일	6일	7일	
KM-AS	150 μ g	0	-	-	-	-	-	-	0
	100 μ g	100	100	100	100	100	100	100	100
KM	1000 μ g	40	20	0	-	-	-	-	0
	750 μ g	80	40	40	40	40	40	40	40
	500 μ g	100	100	100	100	100	100	100	100
	250 μ g	100	100	100	100	100	100	100	100

<170> 실시예 40: KM 분획의 종양전이 억제효과

<171> KM 분획의 활성조사로서 항종양전이 억제활성을 조사하였다. 실험방법은 실시예 10과 동일한 방법에 준한 예방효과를 실시하였고 대조군으로는 KM-110(100 μ g), KM-AS(2 μ g) 및 KML-C를 사용하였다. 표 22의 결과에 나타난 바와 같이 양성대조군과 KM 분획간의 활성 차이는 없는 것으로 보여 KM 분획은 KM-110의 활성은 그대로 존재하는 것으로 사료되었

다.

<172> 【표 22】

KM 분획의 종양전이 억제효과

시료	투여량	폐암전이수 ±표준편차(저해%)	범위
대조군	-	186 ±25(-)	156-210
KM-110	100 μ g	25 ±6(86.6)	19-32
KM-AS	2 μ g	22 ±8(88.2)	15-30
KML-C	50ng	30 ±6(83.9)	24-37
KM	5 μ g	20 ±5(89.2)	15-25
KM	1 μ g	22 ±6(88.2)	16-28
KM	200ng	40 ±7(78.5)	32-49

【발명의 효과】

<173> 이상, 실시예에서 설명한 바와 같이 한국산 겨우살이 추출물 KM-110과 상기 추출물로부터 분리한 단백질성분 KM-AS, 렉틴성분 KML-C 및 두 렉틴 KML-IIU 및 KML-IIL, 단백질 KM-AS에서 렉틴성분 KML-C를 제거한 C-free-AS로 헤파린 컬럼에 통과시켜 분리한 단백질 KMHBP 및 단백질 KMHBP와 KML-C의 혼합물 KM은 체액성 및 세포성 면역체계를 자극하는 면역증강 효과가 있으며, 동물에 대한 임상 실험결과 종양세포에 대해 직간접적으로 대응하는 대식세포 및 자연살해세포의 활성을 높혀 항종양효과를 나타내는 뛰어난 효과가 있으므로 생물의약 산업상 매우 유용한 발명인 것이다.

【특허청구범위】**【청구항 1】**

면역증강 및/또는 항종양 효능을 나타내는 한국산 겨우살이 추출물 KM-110.

【청구항 2】

한국산 겨우살이의 잎, 줄기 및 열매를 절단하여 동결하거나 동결하지 않은 상태로 세절한 후 증류수에 넣고 교반하다가 원심분리하여 얻은 상등액을 구멍크기가 다른 멤브레인 필터에 순차적으로 여과하여 얻을 수 있는 것을 특징으로 하는 한국산 겨우살이 추출물 KM-110의 제조방법.

【청구항 3】

제 1항 기재의 한국산 겨우살이 추출물 KM-110의 항종양제 및/또는 면역증강제로서의 용도.

【청구항 4】

면역증강 및/또는 항종양 효능을 나타내는 한국산 겨우살이로부터 분리하여 얻을 수 있는 단백질 KM-AS.

【청구항 5】

한국산 겨우살이의 잎, 줄기 및 열매를 세절한 후 염화나트륨을 함유하는 인산염 완충

용액에 넣고 교반한 후 암모니아 설페이트 파우더를 첨가하여 암모니아 설페이트 포화용액을 만들고 약하게 교반하여 침전시켜 얻을 수 있는 것을 특징으로 하는 단백질 KM-AS의 제조방법.

【청구항 6】

제 4항 기재의 한국산 겨우살이 유래의 단백질 KM-AS의 항종양 및/또는 면역증강제로서의 용도.

【청구항 7】

면역증강 및 항종양 효능을 나타내는 한국산 겨우살이 추출물 유래의 렉틴성분 KML-C.

【청구항 8】

한국산 겨우살이 추출물 유래의 단백질 KM-AS를 염산으로 가수분해시킨 세파로스-4B를 충전한 컬럼 크로마토그래피에 통과시키고 PBS로 세척한 후 컬럼에 결합된 물질을 락토오스가 포함된 PBS로 용출하고 PBS에 대한 투석으로 락토오스 성분을 제거하여 얻을 수 있는 것을 특징으로 하는 제 7항 기재의 렉틴성분 KML-C의 제조방법.

【청구항 9】

한국산 겨우살이 추출물 유래의 렉틴성분 KML-C의 항종양 및/또는 면역증강제로서의 용도.
【청구항 9】

【청구항 10】

한국산 겨우살이 추출물로부터 분리하여 얻을 수 있는 분자량 61.8KD의 렉틴 KML-IIU 및/또는 분자량 56.4KD의 렉틴 KML-IIL.

【청구항 11】

제 7항 기재의 렉틴성분 KML-C를 9H7-D10항체를 Hitrp NHS 활성 친화컬럼에 고정시켜 제조한 면역-친화성 컬럼에 통과시켜 PBS로 용출되는 분획을 수집하거나 또는 pH2.7의 글라이신-염산 완충용액에 의해 용출되는 분획을 수집하여 얻을 수 있는 것을 특징으로 하는 제 10항 기재의 렉틴 KML-IIU 및/또는 KML-IIL의 제조방법.

【청구항 12】

한국산 겨우살이 추출물 유래의 렉틴 KML-IIU 및/또는 KML IIL의 항종양 및/또는 면역증강제로서의 용도.

【청구항 13】

제 10항 기재의 렉틴 KML-IIU 및/또는 KML-IIL의 유전자.

【청구항 14】

제 13항에 있어서, 렉틴 KML-IIU는 서열목록 1에 기재되어 있고 렉틴 KML-IIL은 서열 목록 2에 기재된 유전자 염기서열을 갖는 것을 특징으로 하는 렉틴 KML-IIU 또는 KML-IIL 유전자 .

【청구항 15】

제 4항에 기재된 단백질 KM-AS에서 렉틴성분 KML-C가 제거된 단백질 분획 C-free AS를 헤파린 컬럼에 반응시켜 10mM ~ 1M의 NaCl로 용출시켜 얻을 수 있는 것을 특징으로 하는 IFN- γ 유도활성을 가지는 단백질 분획 KMHBP.

【청구항 16】

제 15항 기재의 IFN- γ 유도활성을 가지는 단백질 분획 KMHBP의 항종양 및/또는 면역증강제로서의 용도.

【청구항 17】

제 7항 기재의 렉틴성분 KML-C와 제 15항 기재의 단백질 분획 KMHBP을 혼합하여 얻을 수 있는 것을 특징으로 하는 면역증강활성 및 항종양활성이 있는 분획

KM.

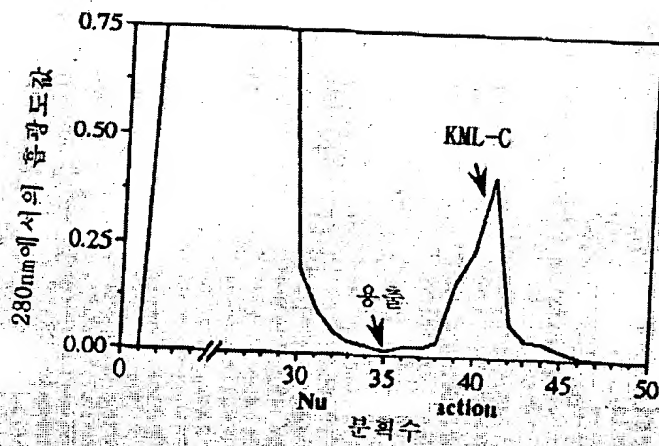
【청구항 18】

제 17항 기재의 분획 KM의 항종양 및/또는 면역증강제로서의 용도.

【도면】

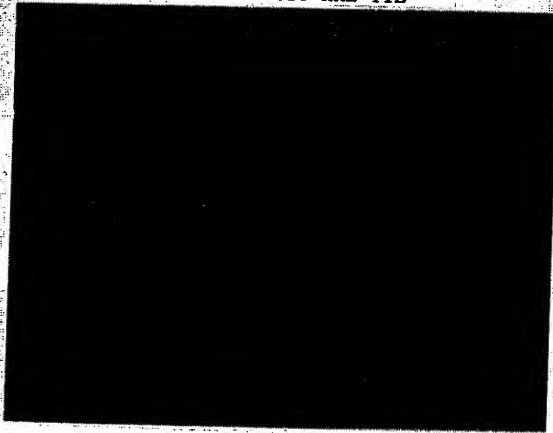
【도 1】

A) 크로마토그램

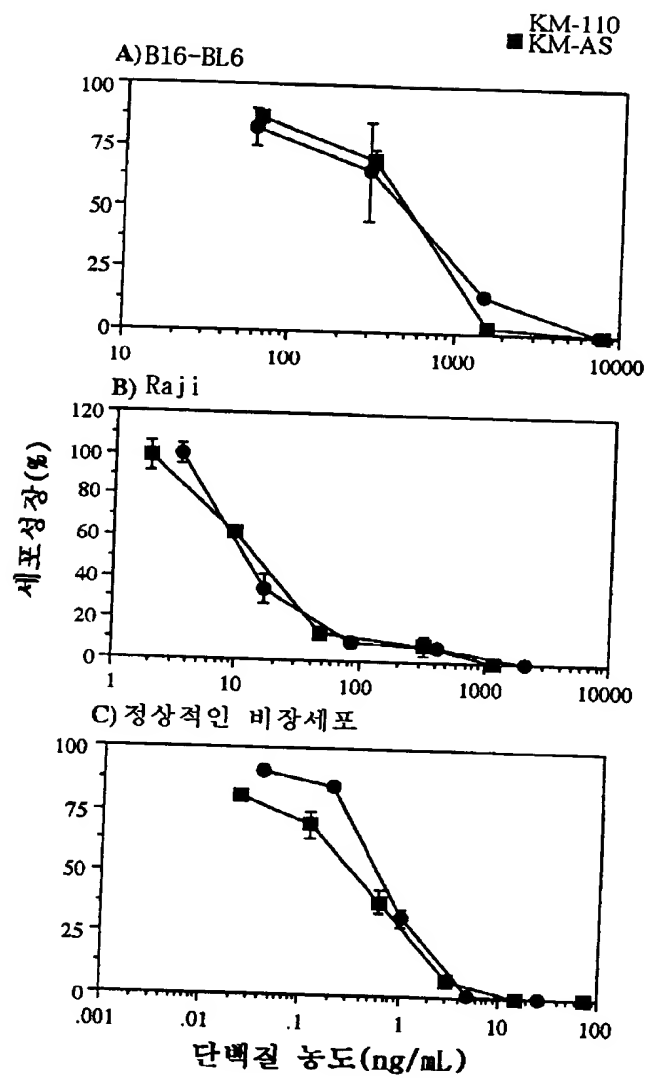


B) 전기영동

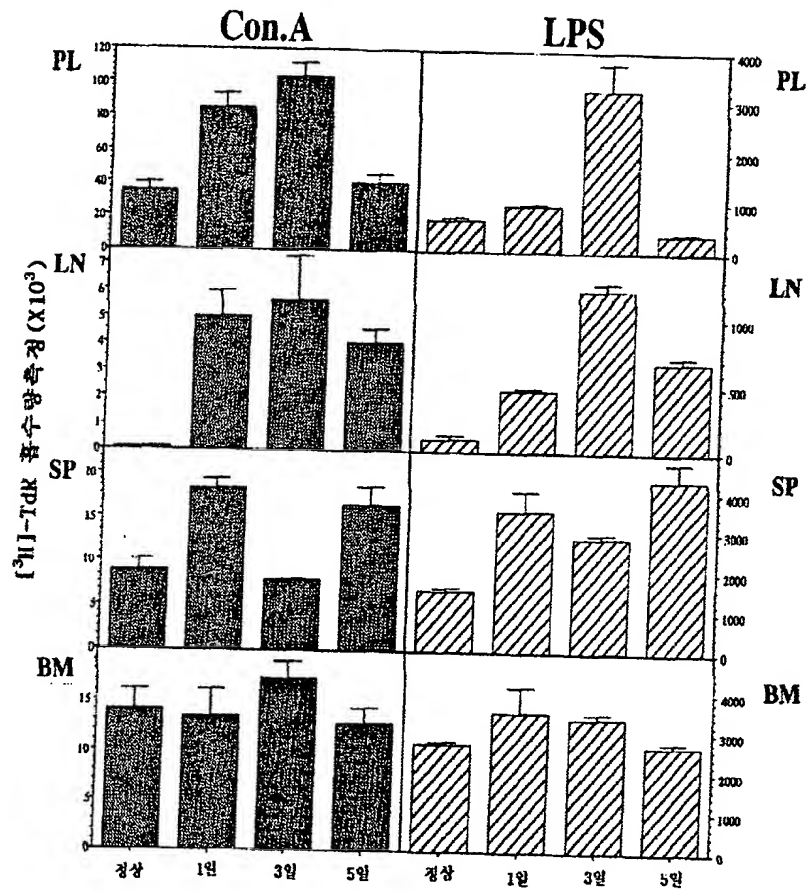
KML-C KML-IIU KML-IIL



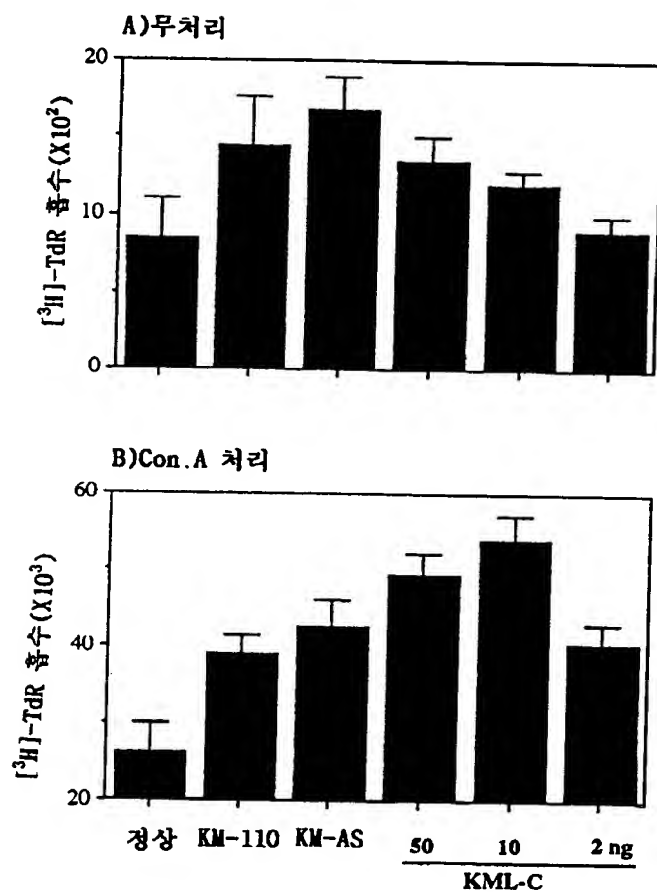
【도 2】



【도 3】

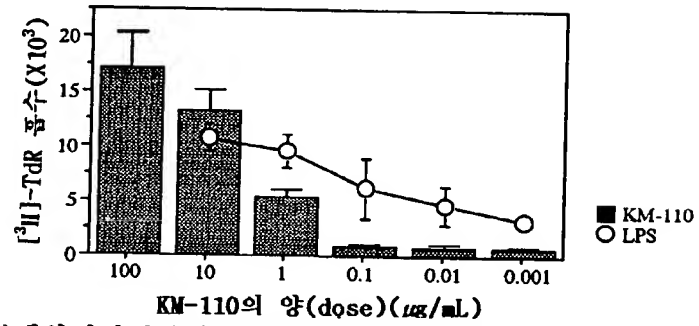


【도 4】

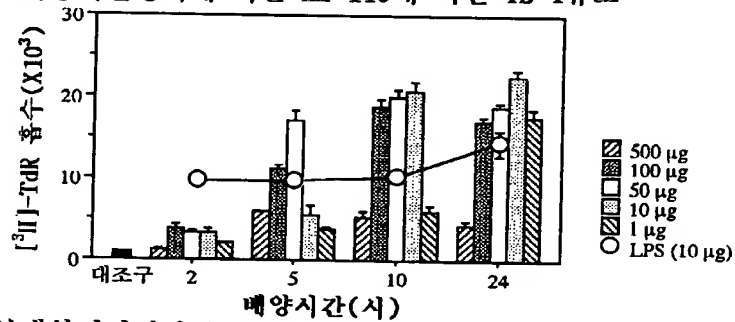


【도 5】

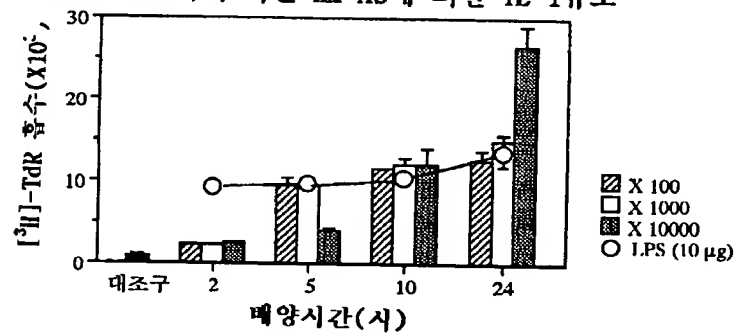
A) 여러 농도에서 KM-110에 의한 IL-1유도



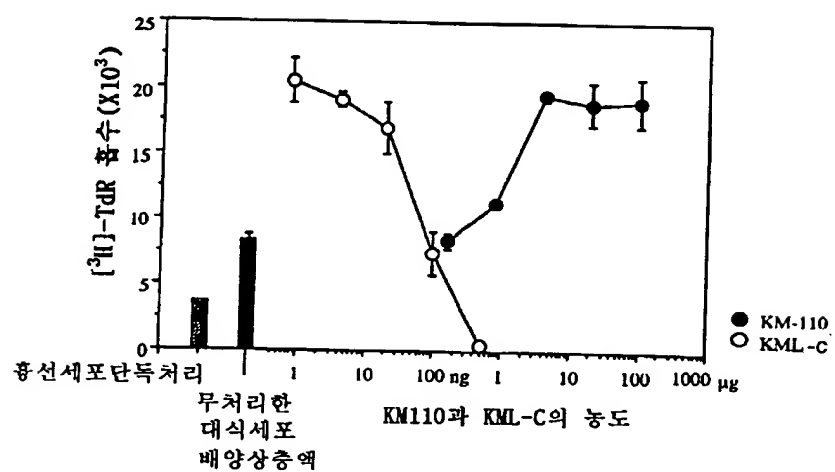
B) 배양시간경과에 따른 KM-110에 의한 IL-1유도



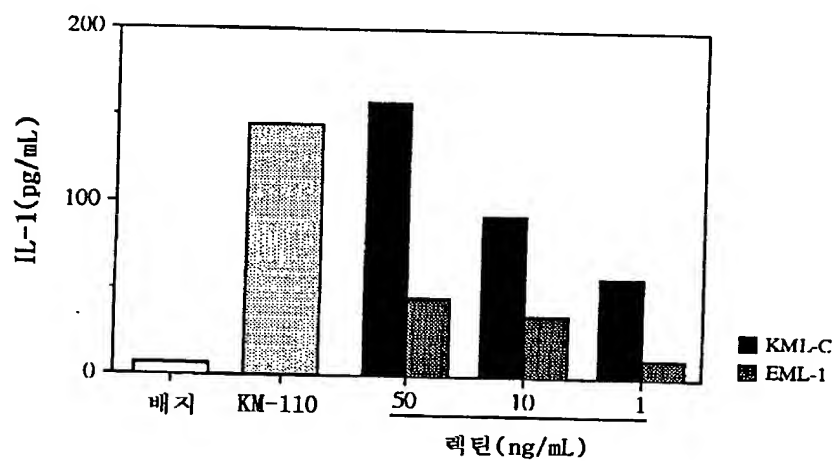
C) 배양시간경과에 따른 KM-AS에 의한 IL-1유도



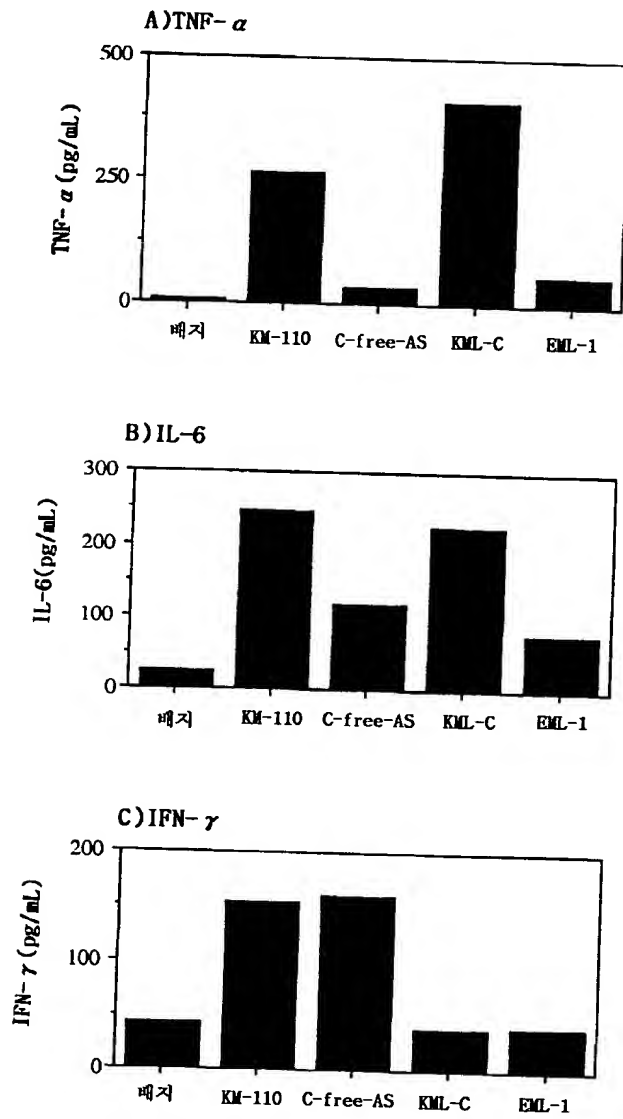
【도 6】



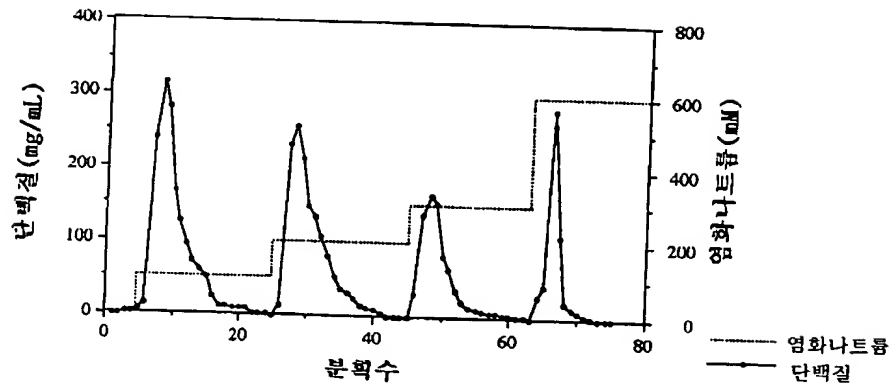
【도 7】



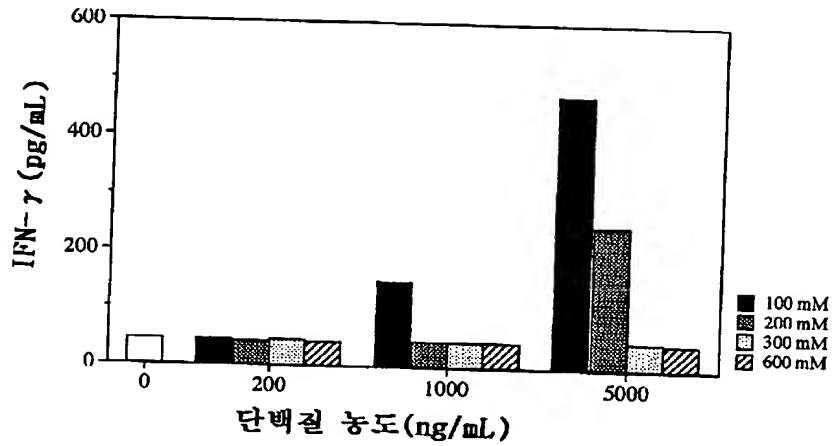
【도 8】



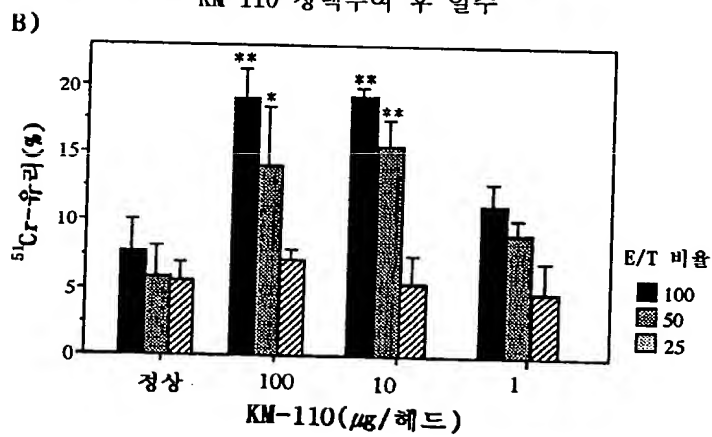
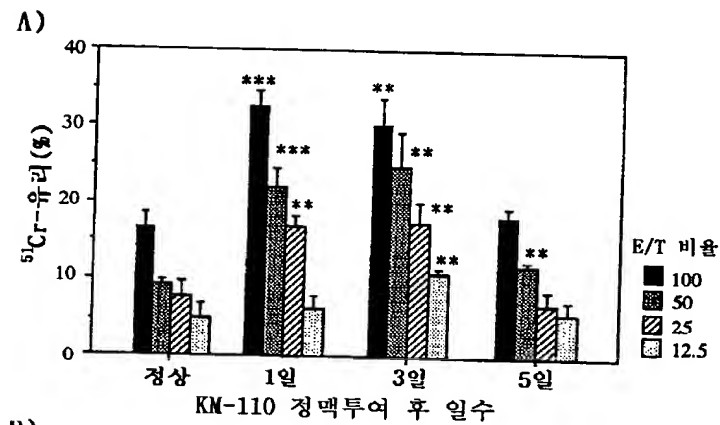
【도 9】



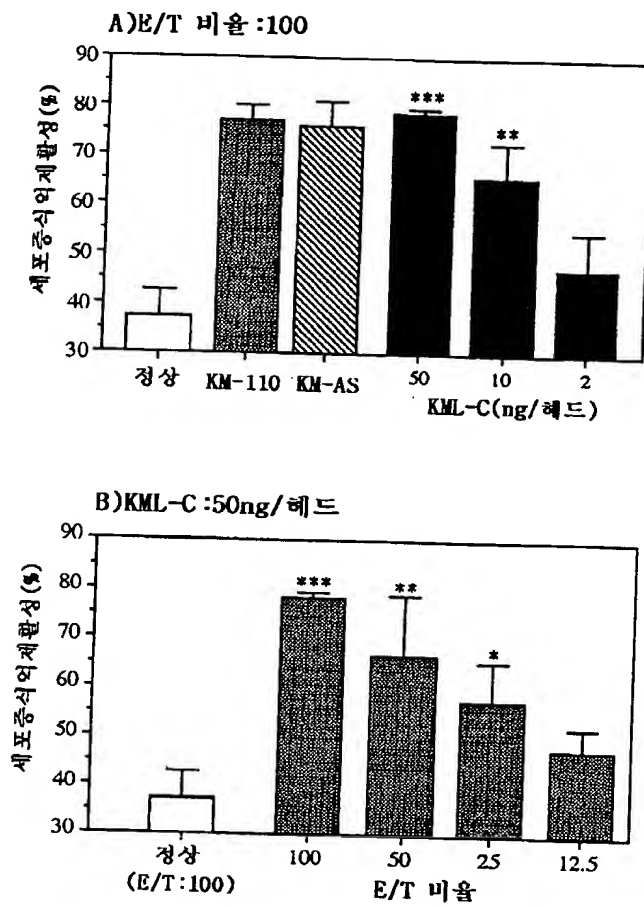
【도 10】



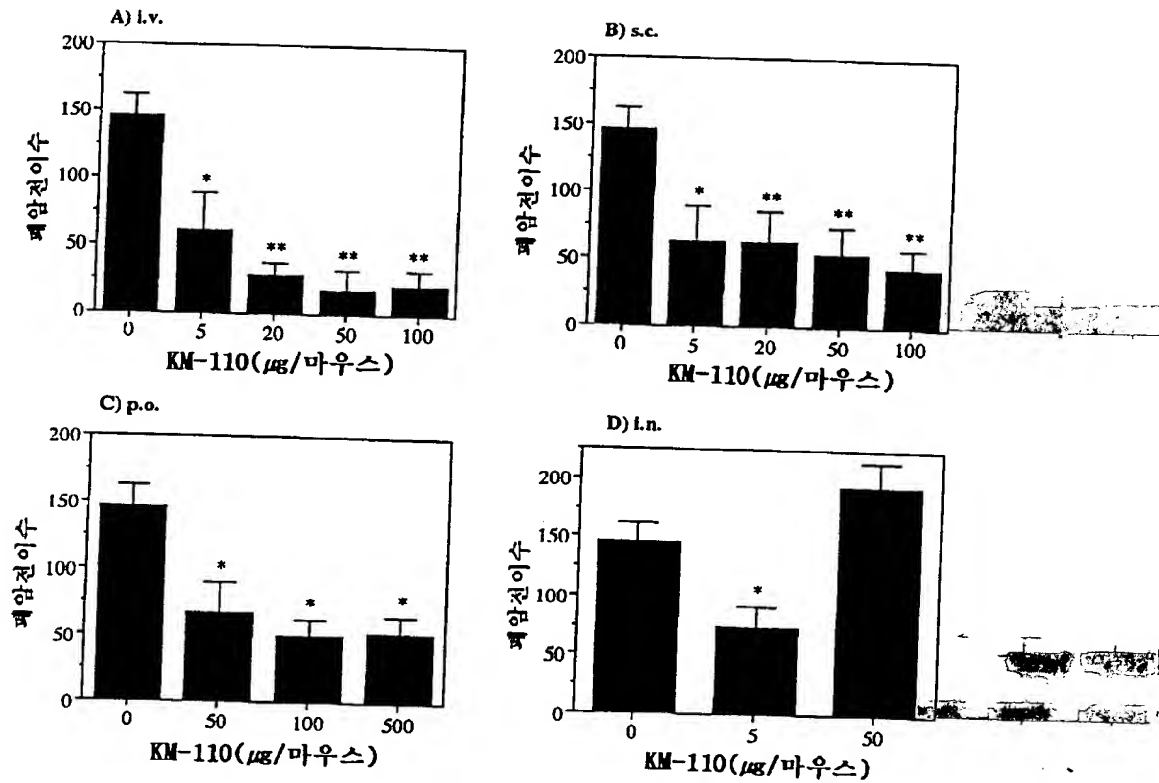
【도 11】



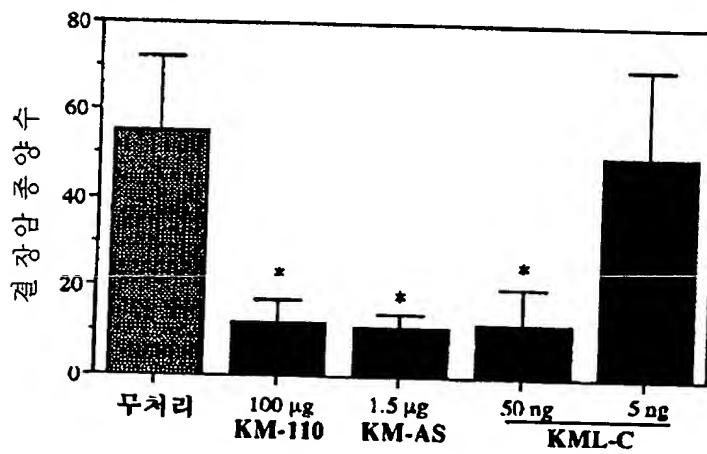
【도 12】



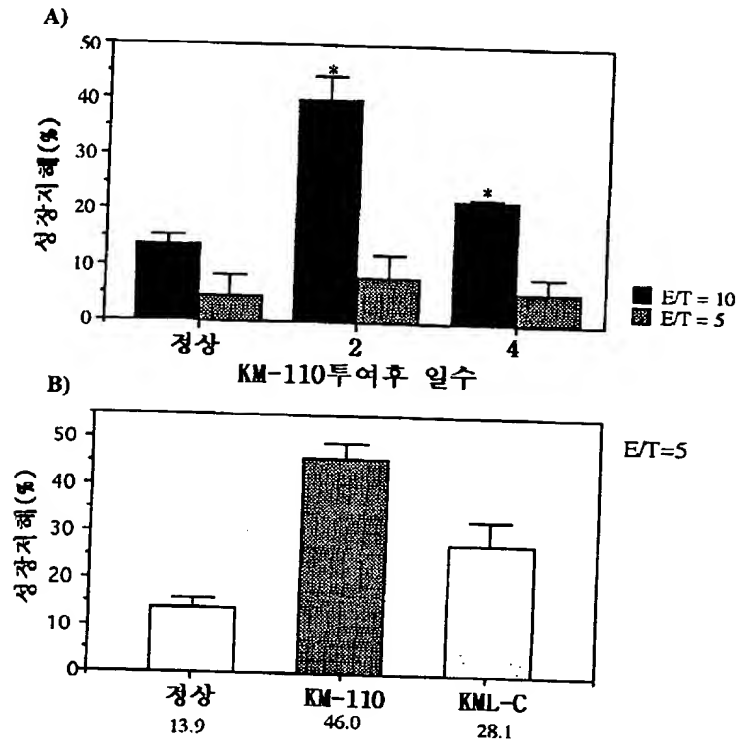
【도 13】



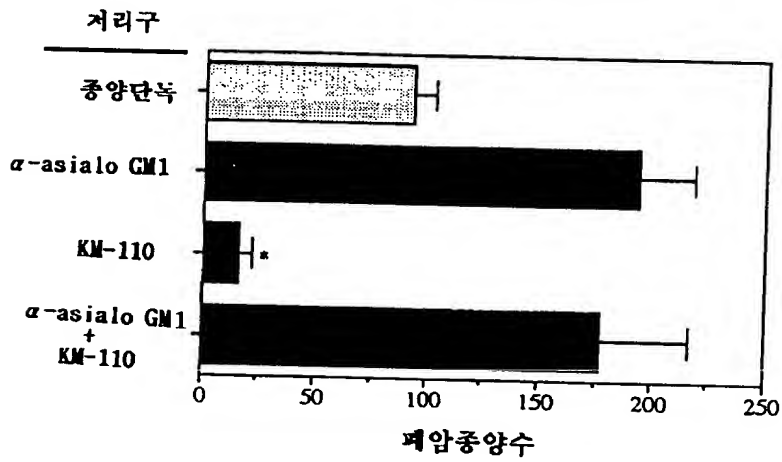
【도 14】



【도 15】

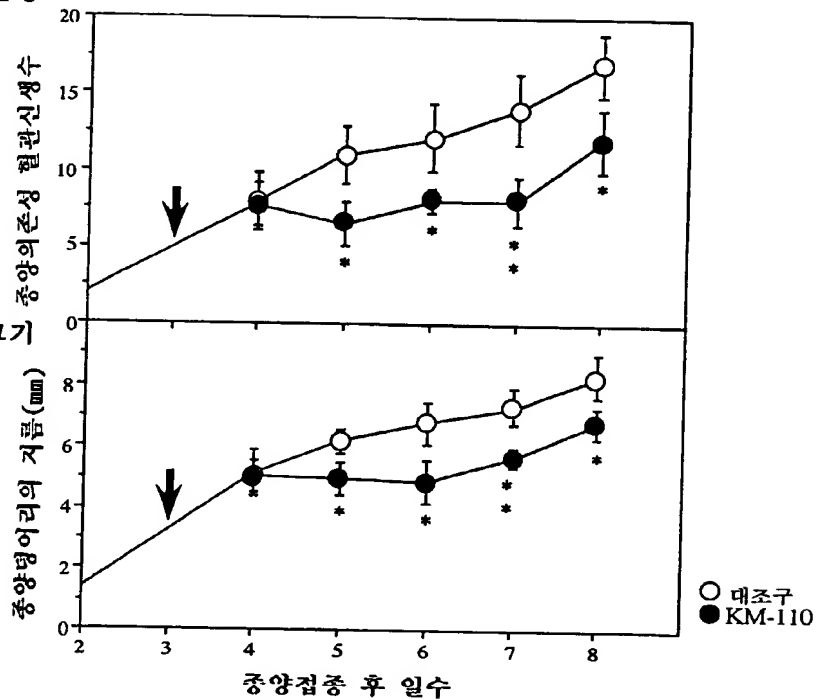


【도 16】

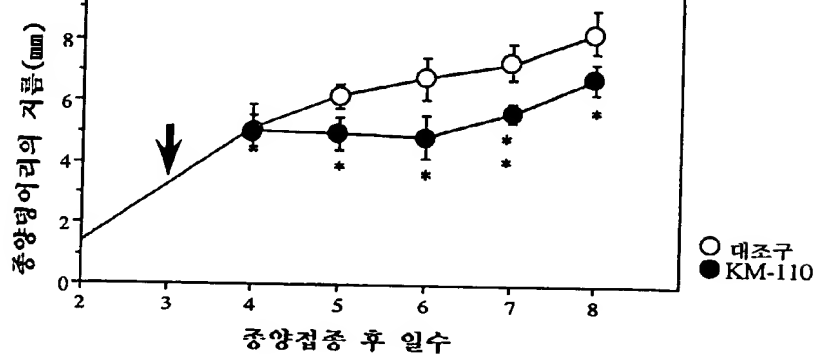


【도 17】

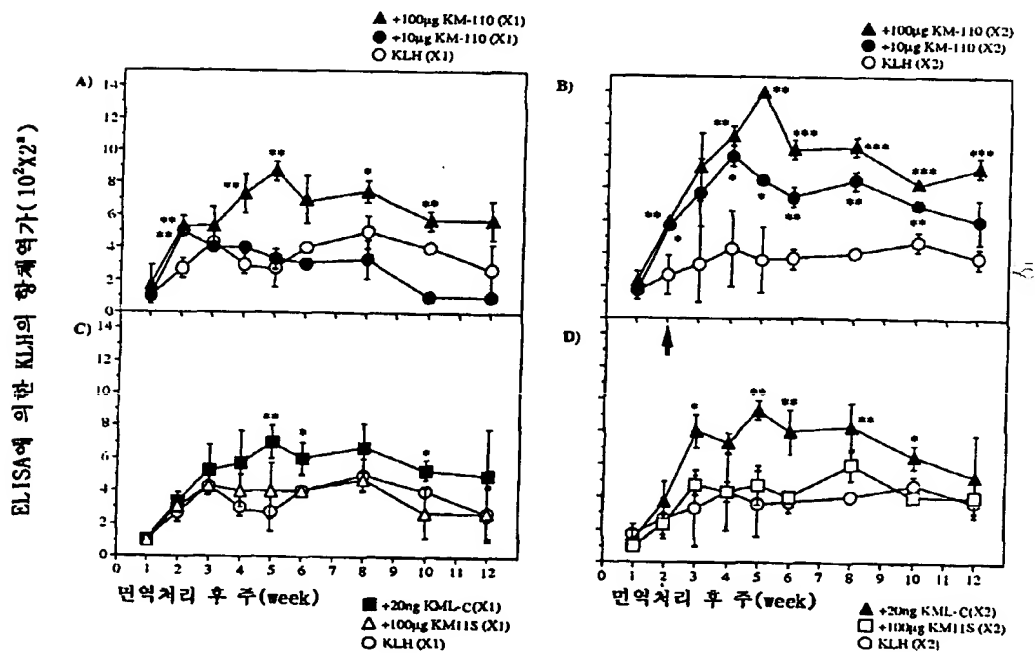
A) 혈관신생



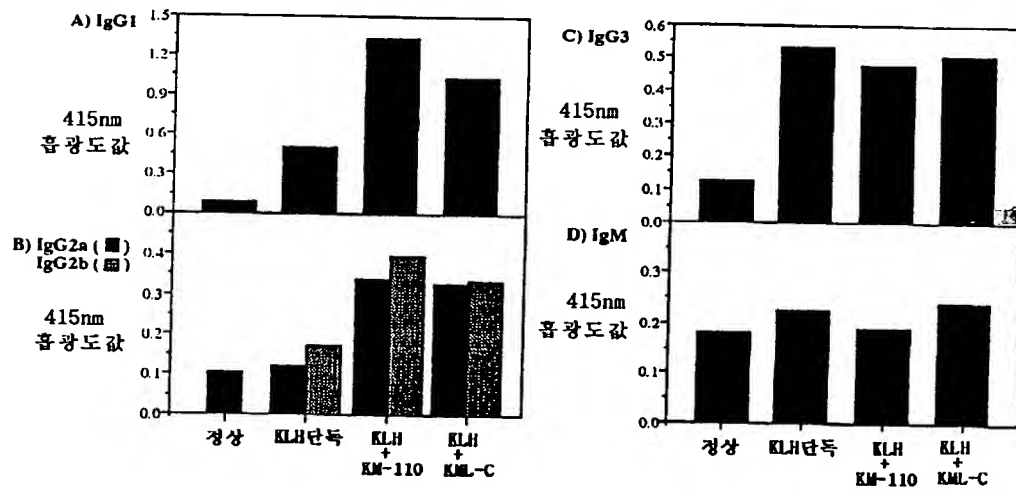
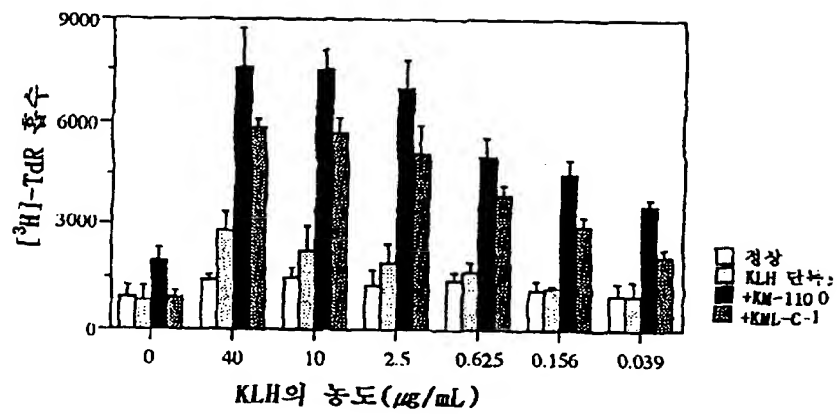
B) 종양크기



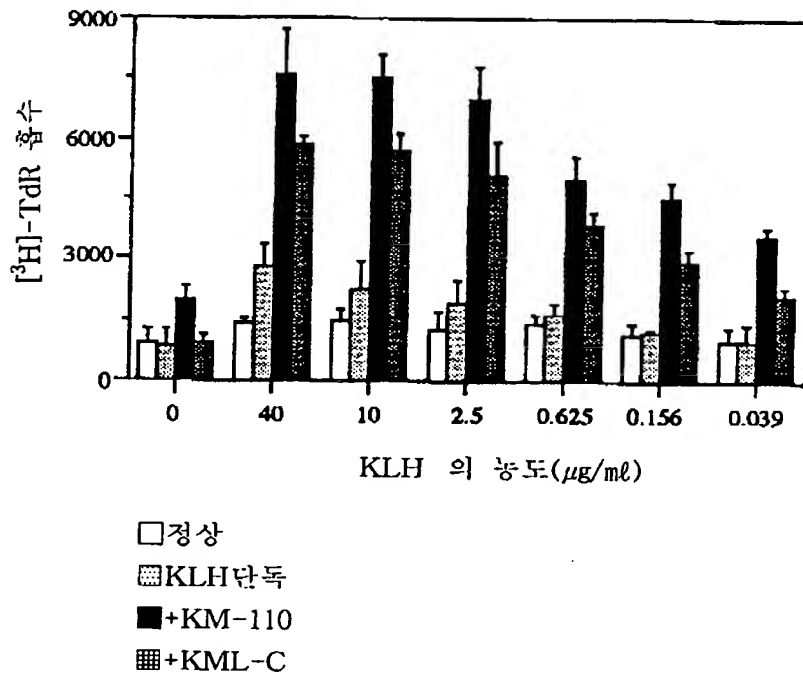
【도 18】



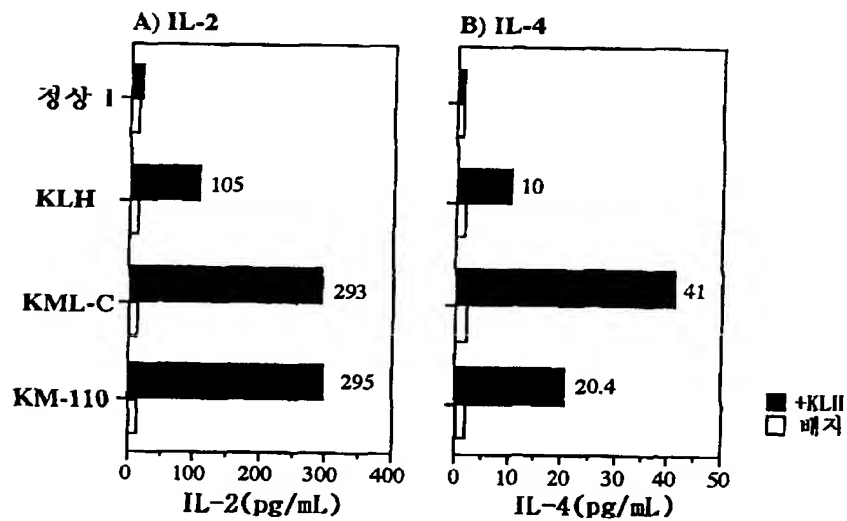
【도 19】



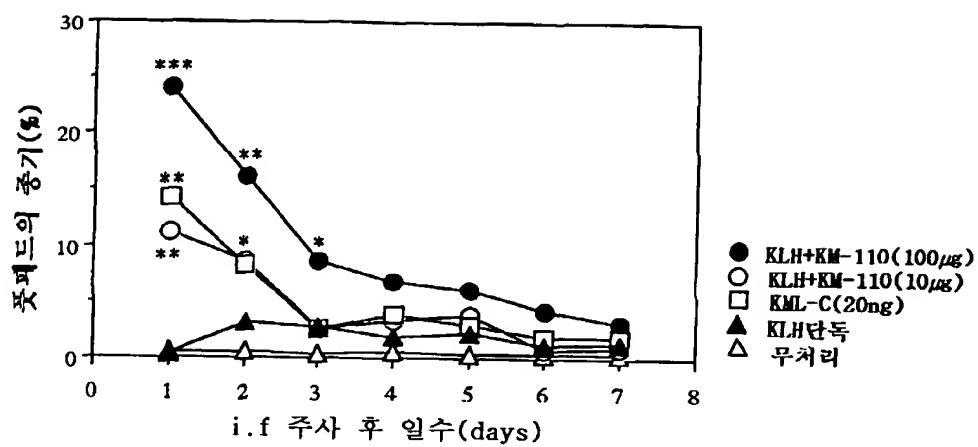
【도 20】



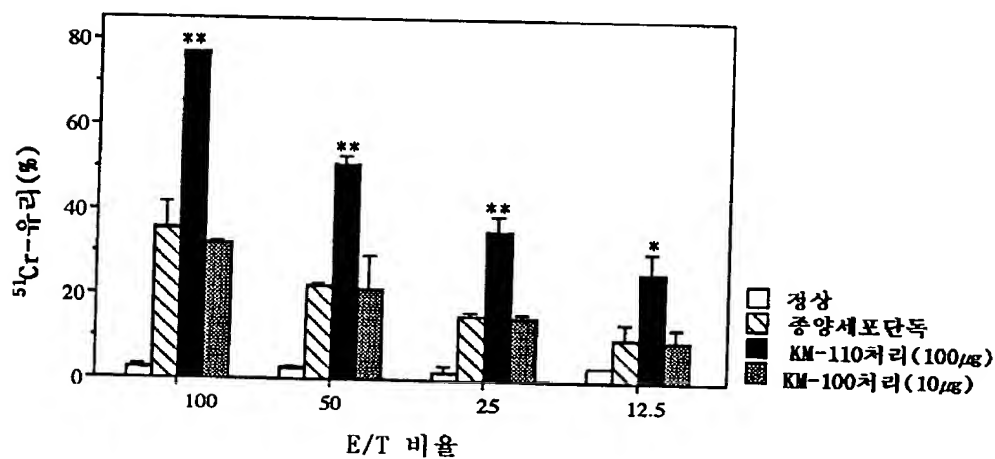
【도 21】



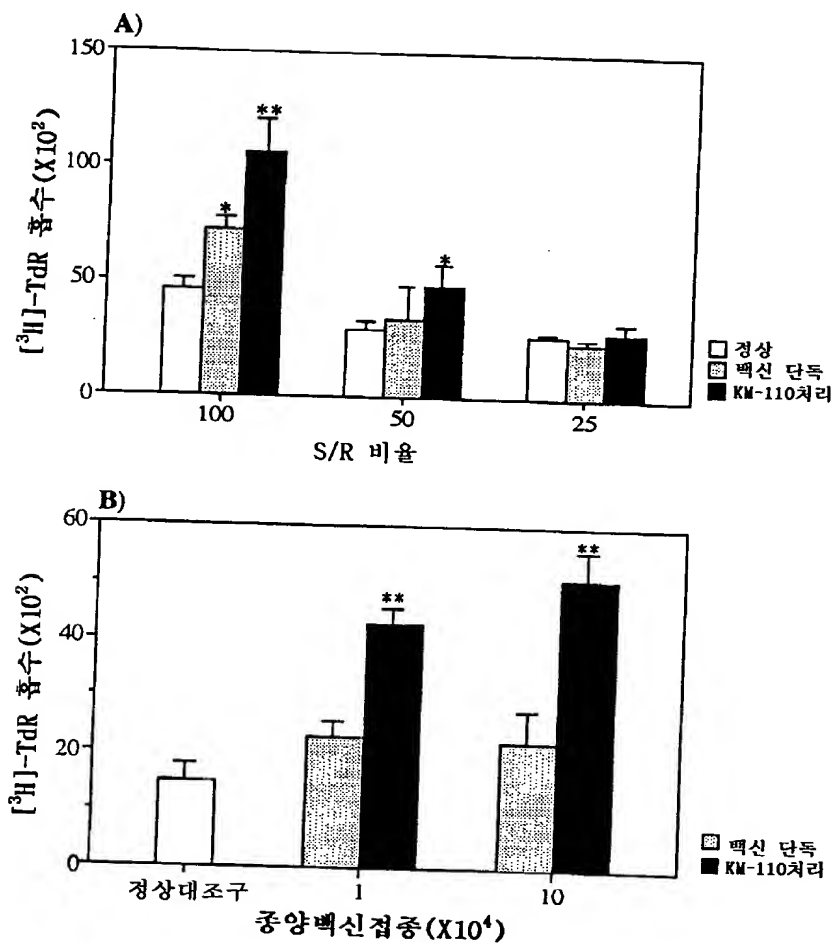
【도 22】



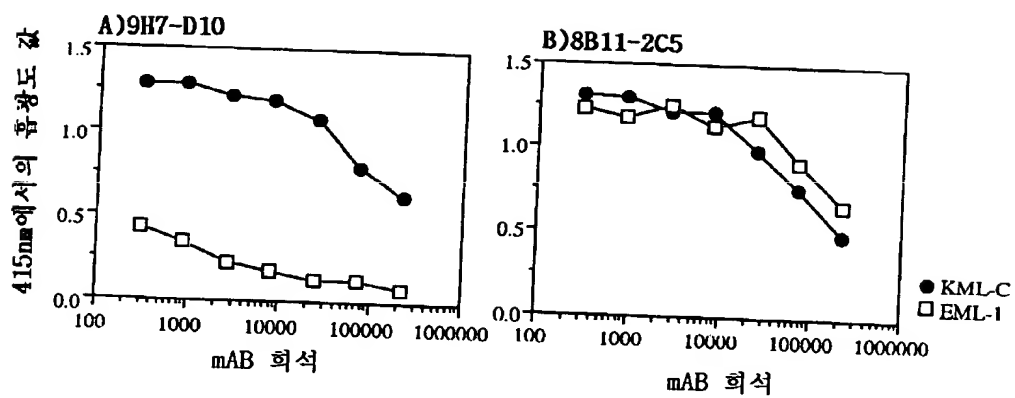
【도 23】



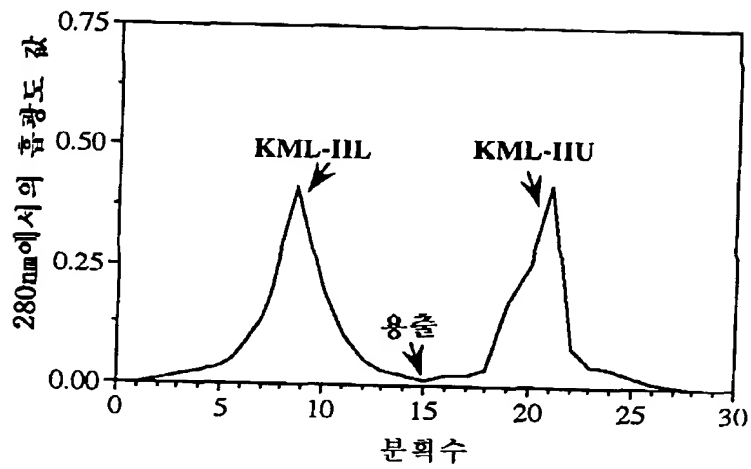
【도 24】



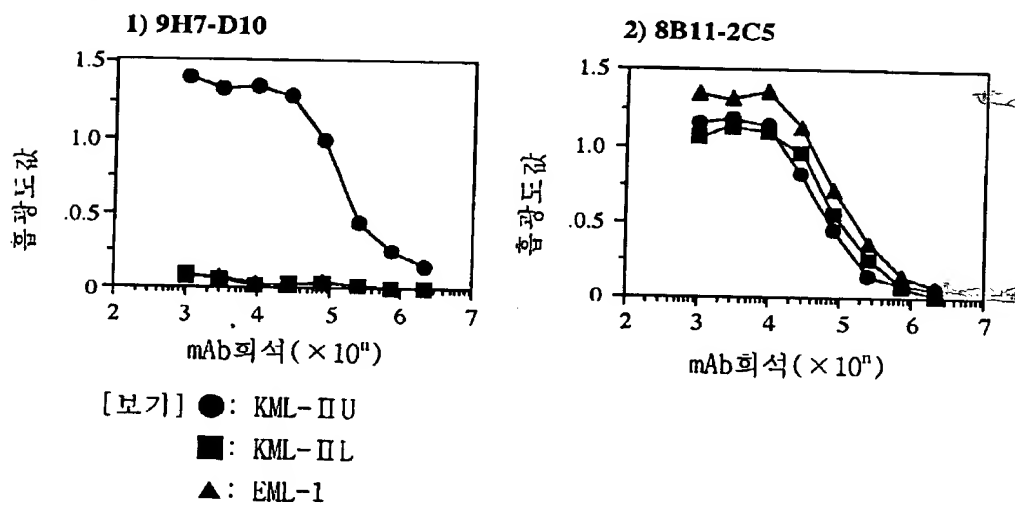
【도 25】



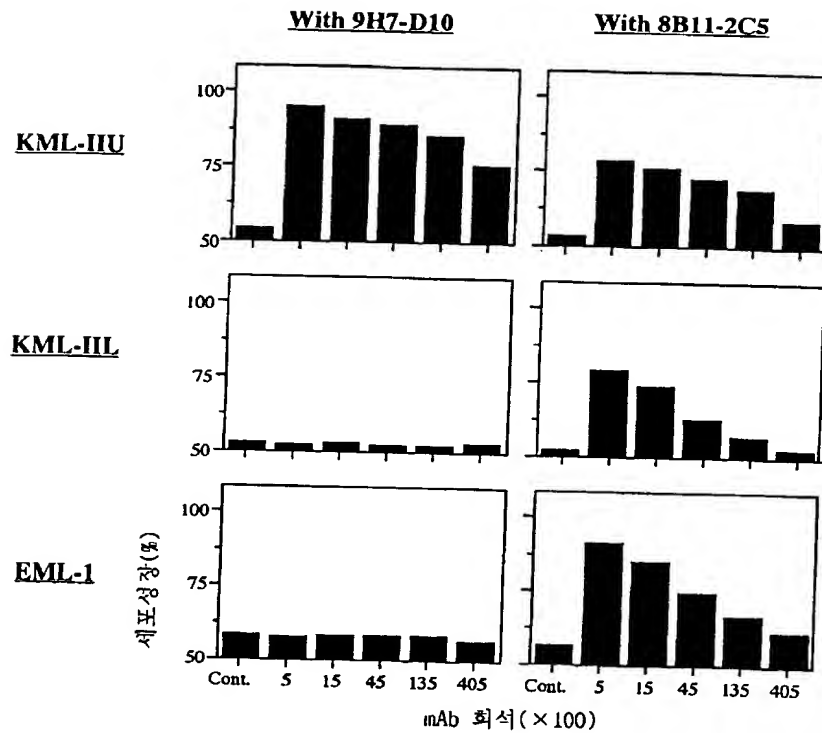
【도 26】



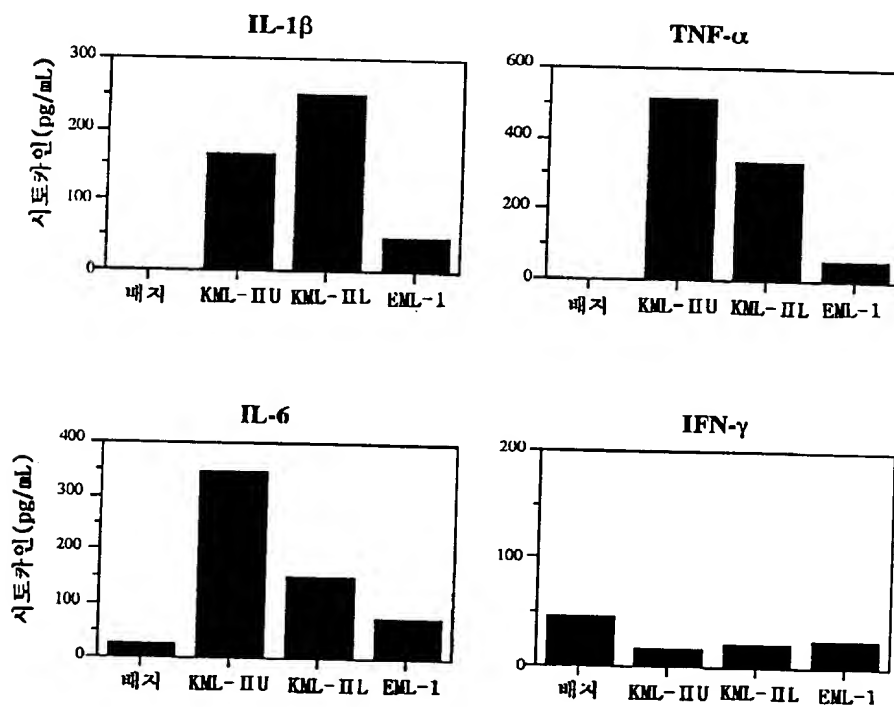
【도 27】



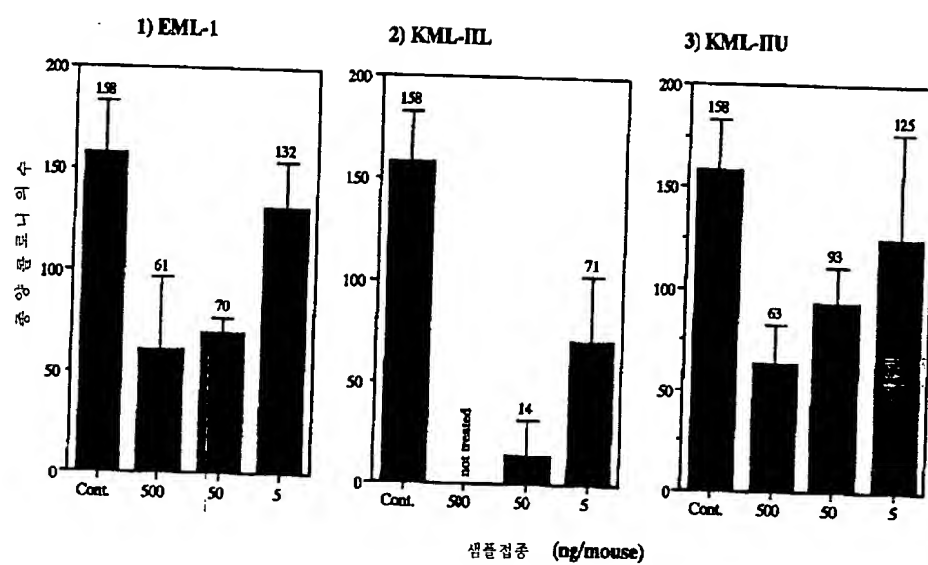
【도 28】



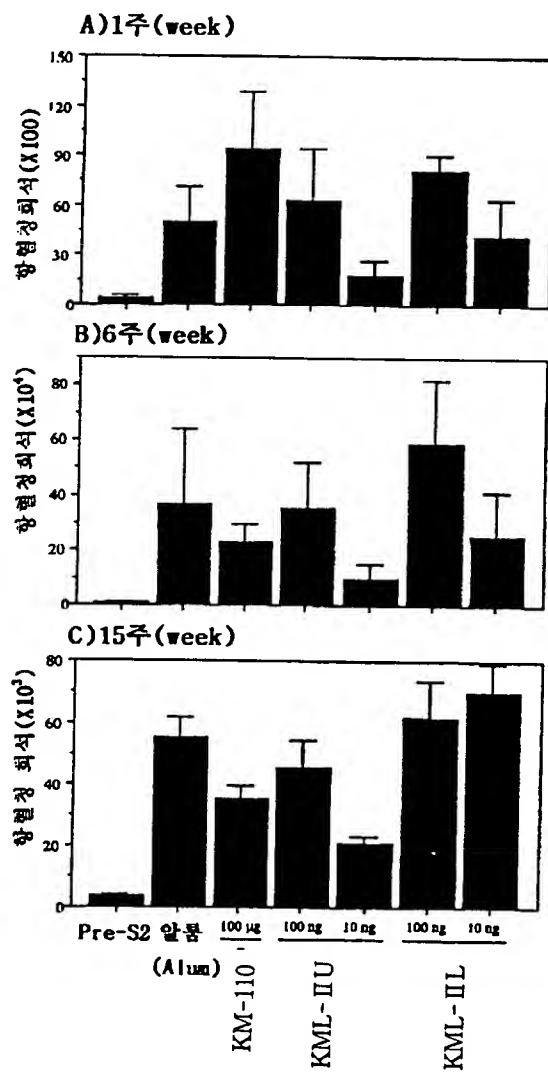
【도 29】



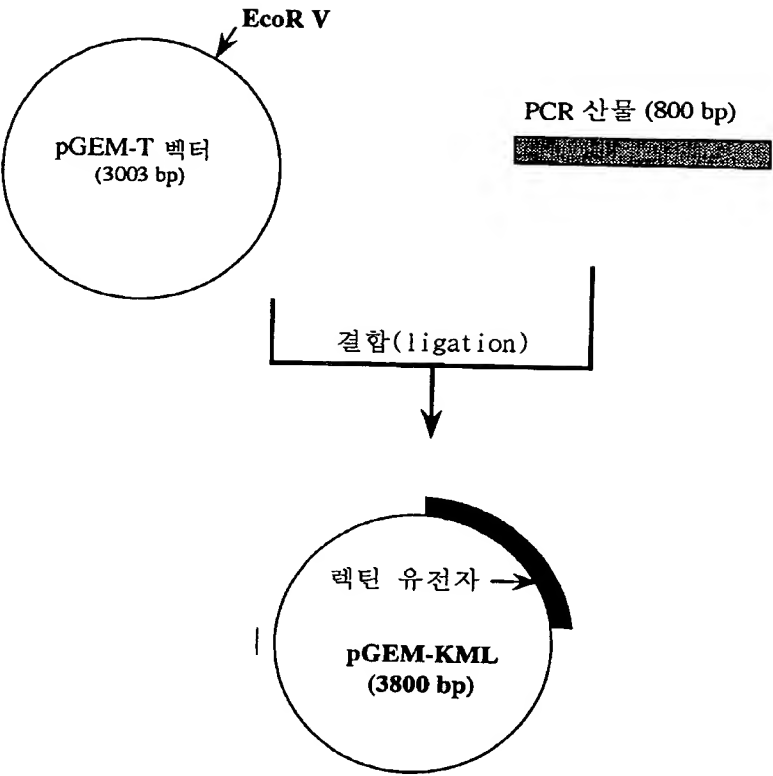
【도 30】



【도 31】



【도 32】



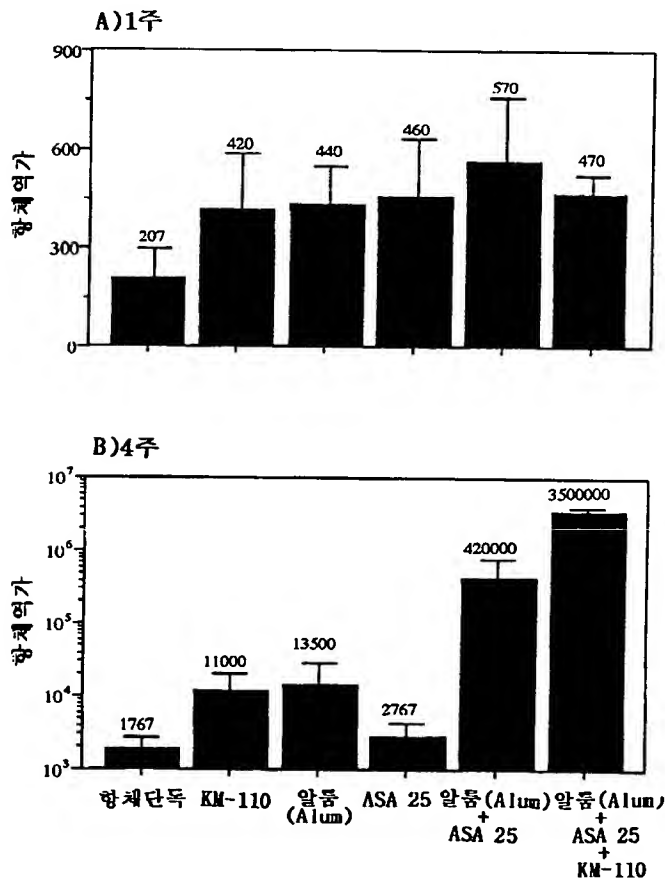
【도 33】

CAT CAG ACG ACG GGC GAC GAA TAT TTC CGG TTC ATC ACG CTT CTC
 H Q T T G D E Y F R F R T L L
 CGA GAT TAT GTC TCA AGC GGA AGC TTT TCC AAT GAG ATA CCA CTC
 R D Y V S S G S F S N E I P L
 TTG CGT CAG TCT ACG ATC CCC GTC TCG GAT GCG CAA AGA TTT GTG
 L R Q S T I P V S D A Q R F V
 TTG GTG GAA CTC ACC AAT CAG GGG GGA GAC TCG ATC ACG GCC GCC
 L V E L T N Q G G D S I T A A
 ATC GAC GTT ACC AAT CTG TAC GTG GTG GCT TAC CAA GCA GGC GAC
 I D V T N L Y V V A Y Q A G D
 CAA TCC TAC TTT TTG CGC GAC GCA CCA GAC GGC GCG GAA AGG CAT
 Q S Y F L R D A P D G A E R H
 CTC TTC ACC GGC ACC ACC AGA TCC TCT CTC CCA TTC ACC GGA AGC
 L F T G T T R S S L P F T G S
 TAC ACA GAT CTG GAG CGA TAC GCC GGT CAT AGG GAC CAG ATC CCT
 Y T D L E R Y A G H R D Q I P
 CTG GGT ATA GAG GAA CTC ATT CAA TCC GTC TCG GCG CTT CGT TAT
 L G I E E L I Q S V S A L R Y
 CCA GGC GGC AGC ACC CGG GCC CAA GCT CGT TCC CTT ATA ATC CTC
 P G G S T R A Q A R S L I I L
 ATT CAG ATG ATC TCC GAG GCC GCG AGA TTC AAT CCC ATC TTT TGG
 I Q M I S E A A R F N P I F W
 AGG GCT CGC CAA TAC ATT AAC AGC GGG GAG TCA TTT CTT CCC GAC
 R A R Q Y I N S G E S F L P D
 ATG TAC ATG CTC GAG CTG GAG ACT AGT TGG GGC CAA CAA TCC ACG
 M Y M L E L E T S W G Q Q S T
 CAA GTC CAG CAG TCT ACG GAT GGC GTT TTT AAT AAC CCA TTT CGG
 Q V Q Q S T D G V F N N P F R
 TTG GGT ATA TCC ACC GGT AAC TTC GTG ACG TTG AGC AAT GTT CGC
 L G I S T G N F V T L S N V R
 GAC GTG ATC CCC AGC TTA GCG ATC ATG TTG TTT GTA TGT AGG GAC
 D V I A S L A I M L F V C R D
 CGA CCA TCT TCC TCC GAC GTG CGC TAT TGG CCG CTG GTC ATA CGA
 R P S S S D V R Y W P L V I R
 CCC GTC TTG GAA AAT AGC GGC GCC GTC GAC GAT GTT ACC TGC ACT
 P V L E N S G A V D D V T C T
 GCT TCC GAA CCC ACC GTG CGC ATC GTA
 A S E P T V R I V

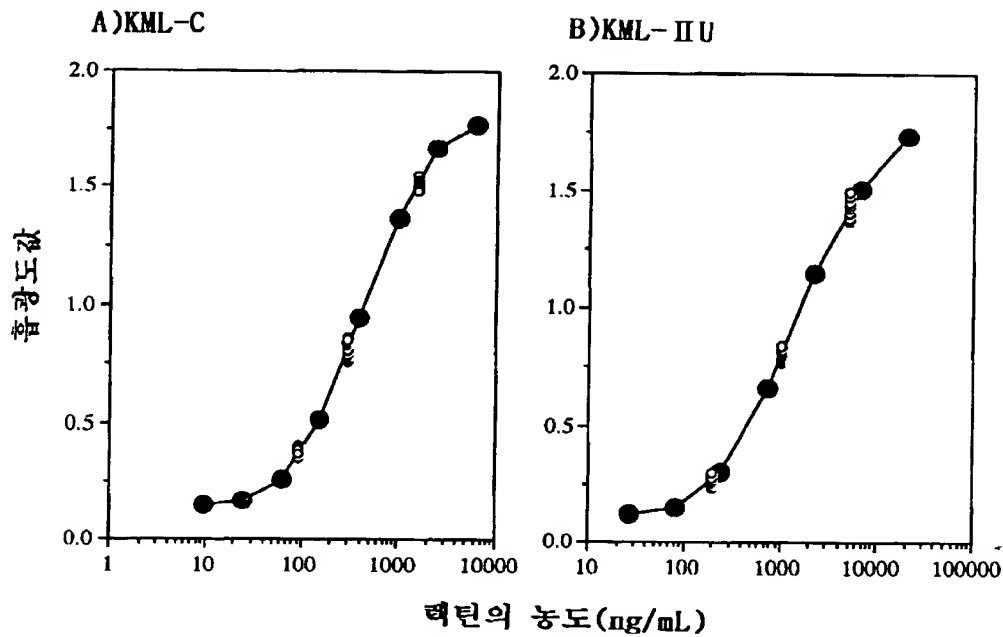
【도 34】

GCC AGA TTC AAT CCC ATC NTG TGG AGG CTT CGC CGG CAA ATT AAC
 A R F N P I X W R L R R Q I N
 AGT GGG GAG TCN TCT CCA CCA AAC ATG TAC ATG CTC GAG CTG GAG
 S G E S S P P N M Y M L E L E
 ACG AGT TGG GGT CGA CAA TCC ACC CAA GTC CAG CAG TCC AAG GAT
 T S W G R Q S T Q V Q Q S K D
 GGC ATT TTT AAT ACC CAA ATA AGA TTG CAG ATT TCC GCC GGT AAC
 G I F N T Q I R L Q I S A G N
 TTT GTG ACG NTG AGC AAT GTT CGC GAC GTG ATC TCC AGC TTG GCG
 F V T X S N V R D V I S S L A
 ATC ATG TTG TTC GAA TGC AGT GGT CGG CCA TTC TCC TCT CTC GAC
 I M L F E C S G R P F S S L D
 CAC CCT TCG CCG CTG CTC CTA AGG TCC GTC GTG GAT GCG GCC AAC
 H P S P L L L R S V V D A A N
 GAT GTC ACC TGC ACT NTT TCC GAA CCC ACC GTG CGC ATC GTA
 D V T C T X S E P T V R I V

【도 35】



【도 36】



【서열목록】

<110> KIM, Jong Bae <120> Crude extract from Viscum album
coloratum, protein and lectins is isolated therefrom <160> 4
<170> KOPATIN 1.5 <210> 1 <211> 837 <212> DNA
<213> Viscum album coloratum <220> <221> CDS <222>
(1)..(837) <223> Lectin gene isolated from Viscum album coloratum
<400> 1 cat cag acg acg ggc gac gaa tat ttc cgg ttc atc acg ctt ctc cga
48 His Gln Thr Thr Gly Asp Glu Tyr Phe Arg Phe Ile Thr Leu Leu Arg 1
5 10 15 gat tat gtc tca agc gga agc ttt tcc
aat gag ata cca ctc ttg cgt 96 Asp Tyr Val Ser Ser Gly Ser Phe Ser Asn Glu
Ile Pro Leu Leu Arg 20 25 30

cag tct acg atc ccc gtc tcg gat gcg caa aga ttt gtg ttg gtg gaa 144 Gln Ser
 Thr Ile Pro Val Ser Asp Ala Gln Arg Phe Val Leu Val Glu 35
 40 45 ctc acc aat cag ggg gga gac tcg atc acg gcc gc
 atc gac gtt acc 192 Leu Thr Asn Gln Gly Gly Asp Ser Ile Thr Ala Ala Ile Asp
 Val Thr 50 55 60 aat ct
 tac gtg gtg gct tac caa gca ggc gac caa tcc tac ttt ttg 240 Asn Leu Tyr Val
 Val Ala Tyr Gln Ala Gly Asp Gln Ser Tyr Phe Leu 65 70
 75 80 cgc gac gca cca gac ggc gcg gaa agg cat ctc ttc acc ggc ac
 acc 288 Arg Asp Ala Pro Asp Gly Ala Glu Arg His Leu Phe Thr Gly Thr Thr
 85 90 95 aga tcc tct ctc cca ttc acc gga ag
 tac aca gat ctg gag cga tac 336 Arg Ser Ser Leu Pro Phe Thr Gly Ser Tyr Thr
 Asp Leu Glu Arg Tyr 100 105 110
 gcc ggt cat agg gac cag atc cct ctg ggt ata gag gaa ctc att caa 384 Ala Gly
 His Arg Asp Gln Ile Pro Leu Gly Ile Glu Glu Leu Ile Gln 115
 120 125 tcc gtc tcg gcg ctt cgt tat cca ggc ggc agc
 acc cgg gcc caa gct 432 Ser Val Ser Ala Leu Arg Tyr Pro Gly Gly Ser Thr Arg
 Ala Gln Ala 130 135 140 c
 tcc ctt ata atc ctc att cag atg atc tcc gag gcc gcg aga ttc 480 Arg Ser Leu
 Ile Ile Leu Ile Gln Met Ile Ser Glu Ala Ala Arg Phe 145 150
 155 160 aat ccc atc ttt tgg agg gct cgc caa tac att aac agc ggg
 gag tca 528 Asn Pro Ile Phe Trp Arg Ala Arg Gln Tyr Ile Asn Ser Gly Glu Ser

165 170 175 ttt ctt ccc gac atg tac atg ctc
 gag ctg gag act agt tgg ggc caa 576 Phe Leu Pro Asp Met Tyr Met Leu Glu Leu
 Glu Thr Ser Trp Gly Gln 180 185 190
 caa tcc acg caa gtc cag cag tct acg gat ggc gtt ttt aat aac cca 624 Gln Ser
 Thr Gln Val Gln Gln Ser Thr Asp Gly Val Phe Asn Asn Pro 195
 200 205 ttt cgg ttg ggt ata tcc acc ggt aac ttc gtg
 acg ttg agc aat gtt 672 Phe Arg Leu Gly Ile Ser Thr Gly Asn Phe Val Thr Leu
 Ser Asn Val 210 215 220 c
 gac gtg atc gcc agc tta gcg atc atg ttg ttt gta tgt agg gac 720 Arg Asp Val
 Ile Ala Ser Leu Ala Ile Met Leu Phe Val Cys Arg Asp 225 230
 235 240 cga cca tct tcc tcc gac gtg cgc tat tgg ccg ctg gtc ata
 cga ccc 768 Arg Pro Ser Ser Ser Asp Val Arg Tyr Trp Pro Leu Val Ile Arg Pro
 245 250 255 gtc ttg gaa aat agc ggc gcc gtc
 gac gat gtt acc tgc act gct tcc 816 Val Leu Glu Asn Ser Gly Ala Val Asp Asp
 Val Thr Cys Thr Ala Ser 260 265 270
 gaa ccc acc gtg cgc atc gta 837 Glu Pro
 Thr Val Arg Ile Val 275
 <210> 2 <211> 279 <212> PRT <213> Viscum album coloratum
 <400> 2 His Gln Thr Thr Gly Asp Glu Tyr Phe Arg Phe Ile Thr Leu Leu Arg 1
 5 10 15 Asp Tyr Val Ser Ser Gly Ser Phe Ser As
 Glu Ile Pro Leu Leu Arg 20 25 30

Gln Ser Thr Ile Pro Val Ser Asp Ala Gln Arg Phe Val Leu Val Glu 35
 40 45 Leu Thr Asn Gln Gly Gly Asp Ser Ile Thr Ala Ala
 Ile Asp Val Thr 50 55 60 Asn
 Leu Tyr Val Val Ala Tyr Gln Ala Gly Asp Gln Ser Tyr Phe Leu 65 70
 75 80 Arg Asp Ala Pro Asp Gly Ala Glu Arg His Leu Phe Thr Gly Thr
 Thr 85 90 95 Arg Ser Ser Leu
 Pro Phe Thr Gly Ser Tyr Thr Asp Leu Glu Arg Tyr 100 105
 110 Ala Gly His Arg Asp Gln Ile Pro Leu Gly Ile Glu Glu Leu Ile Gln
 115 120 125 Ser Val Ser Ala Leu Arg Tyr
 Pro Gly Gly Ser Thr Arg Ala Gln Ala 130 135 140
 Arg Ser Leu Ile Ile Leu Ile Gln Met Ile Ser Glu Ala Ala Arg Phe 145
 150 155 160 Asn Pro Ile Phe Trp Arg Ala Arg Gln Tyr
 Ile Asn Ser Gly Glu Ser 165 170 175
 Phe Leu Pro Asp Met Tyr Met Leu Glu Leu Glu Thr Ser Trp Gly Gln 180
 185 190 Gln Ser Thr Gln Val Gln Gln Ser Thr Asp Gly Val Phe
 Asn Asn Pro 195 200 205 Phe Arg
 Leu Gly Ile Ser Thr Gly Asn Phe Val Thr Leu Ser Asn Val 210 215
 220 Arg Asp Val Ile Ala Ser Leu Ala Ile Met Leu Phe Val Cys Arg Asp
 225 230 235 240 Arg Pro Ser Ser Ser
 Asp Val Arg Tyr Trp Pro Leu Val Ile Arg Pro 245 250
 255 Val Leu Glu Asn Ser Gly Ala Val Asp Asp Val Thr Cys Thr Ala Ser

260 265 270 Glu Pro Thr Val Arg Ile Val
 275 <210> 3 <211> 357 <212> DNA
 <213> Viscum album coloratum <220> <221> CDS <222>
 (1)..(357) <223> Lectin gene isolated from Viscum album coloratum
 <400> 3 gcc aga ttc aat ccc atc ntg tgg agg ctt cgc cgg caa att aac agt
 48 Ala Arg Phe Asn Pro Ile Ala Trp Arg Leu Arg Arg Gln Ile Asn Ser 1
 5 10 15 ggg gag tcn tct cca cca aac atg tac
 atg ctc gag ctg gag acg agt 96 Gly Glu Ala Ser Pro Pro Asn Met Tyr Met Leu
 Glu Leu Glu Thr Ser 20 25 30
 tgg ggt cga caa tcc acc caa gtc cag cag tcc aag gat ggc att ttt 144 Trp Gly
 Arg Gln Ser Thr Gln Val Gln Gln Ser Lys Asp Gly Ile Phe 35
 40 45 aat acc caa ata aga ttg cag att tcc gcc ggt aa
 ttt gtg acg ntg 192 Asn Thr Gln Ile Arg Leu Gln Ile Ser Ala Gly Asn Phe Val
 Thr Ala 50 55 60 agc aa
 gtt cgc gac gtg atc tcc agc ttg gcg atc atg ttg ttc gaa 240 Ser Asn Val Arg
 Asp Val Ile Ser Ser Leu Ala Ile Met Leu Phe Glu 65 70
 75 80 tgc agt ggt cgg cca ttc tcc tct ctc gac cac cct tcg ccg ct
 ctc 288 Cys Ser Gly Arg Pro Phe Ser Ser Leu Asp His Pro Ser Pro Leu Leu
 85 90 95 cta agg tcc gtc gtg gat gcg gcc aa
 gat gtc acc tgc act ntt tcc 336 Leu Arg Ser Val Val Asp Ala Ala Asn Asp Val
 Thr Cys Thr Ala Ser 100 105 110

gaa ccc acc gtg cgc atc gta

357 Glu Pro

Thr Val Arg Ile Val

115

<210> 4 <211> 119 <212> PRT <213> Viscum album coloratum

<400> 4 Ala Arg Phe Asn Pro Ile Ala Trp Arg Leu Arg Arg Gln Ile Asn Ser 1

5 10 15 Gly Glu Ala Ser Pro Pro Asn Met Tyr Me

Leu Glu Leu Glu Thr Ser 20 25 30

Trp Gly Arg Gln Ser Thr Gln Val Gln Gln Ser Lys Asp Gly Ile Phe 35

40 45 Asn Thr Gln Ile Arg Leu Gln Ile Ser Ala Gly Asn

Phe Val Thr Ala 50 55 60 Ser

Asn Val Arg Asp Val Ile Ser Ser Leu Ala Ile Met Leu Phe Glu 65 70

75 80 Cys Ser Gly Arg Pro Phe Ser Ser Leu Asp His Pro Ser Pro Leu

Leu 85 90 95 Leu Arg Ser Val

Val Asp Ala Ala Asn Asp Val Thr Cys Thr Ala Ser 100 105

110 Glu Pro Thr Val Arg Ile Val 115

【서류명】	명세서 등 보정서
【수신처】	특허청장
【제출일자】	1999.09.09
【제출인】	
【성명】	김종배
【출원인코드】	4-1998-017543-8
【사건과의 관계】	출원인
【대리인】	
【성명】	이덕록
【대리인코드】	9-1998-000461-7
【포괄위임등록번호】	1999-045936-3
【사건의 표시】	
【출원번호】	10-1999-0030638
【출원일자】	1999.07.27
【발명의 명칭】	한국산 겨우살이 추출물과 이로부터 분리한 단백질 및 상 기단 백질에서 분리한 렉틴
【제출원인】	
【접수번호】	1-1-99-0086298-25
【접수일자】	1999.07.27
【보정할 서류】	명세서등
【보정할 사항】	
【보정대상 항목】	별지와 같음
【보정방법】	별지와 같음
【보정내용】	별지와 같음
【취지】	특허법시행규칙 제13조의 규정에 의하여 위와 같이 제출합 니다. 대리인 이덕록 (인)
【수수료】	
【보정료】	0 원
【추가심사청구료】	0 원
【기타 수수료】	0 원
【합계】	0 원

【보정대상항목】 식별번호 1

【보정방법】 정정

【보정내용】

도 1은 가수분해시킨 세파로스-4B컬럼에 의해 한국산 겨우살이 추출물 유래의 단백질 KM-AS로부터 렉틴성분 KML-C를 분리하는 크로마토그래피 결과와 전기영동 결과를 나타낸다.

【보정대상항목】 식별번호 40

【보정방법】 정정

【보정내용】

따라서, 본 발명의 목적은 한국산 겨우살이로부터 생체면역을 증강시키고 항종양전이활성을 나타내며 세포면역능을 유도하는 백신에 대한 보조액으로 응용할 수 있는 추출물과 이 추출물에 함유된 단백질 및 상기 단백질로부터 분리한 렉틴들을 제공하고, 안전성이 확보된 표준화된 분획을 제공함에 있다. 본 발명의 다른 목적은 상기 렉틴들의 유전자 염기서열을 제공함에 있다.

【보정대상항목】 식별번호 43

【보정방법】 정정

【보정내용】

본 발명은 한국산 겨우살이로부터 증류수를 이용하여 추출물 KM-110을 추출하고 이로부터 암모니아 설페이트 용액을 이용한 침전법으로 단백질 KM-AS 분획을 얻은 단계; 상기 단백질 KM-AS 분획으로부터 렉틴성분 KML-C를 세파로스-4B을 충전한 컬럼 크로마토그래

피 방법으로 분리한 후 폴리아크릴아미드 겔에서 전기영동하여 분자량을 조사하는 단계;
 상기 한국산 겨우살이의 렉틴성분 KML-C과 유럽산 겨우살이의 렉틴성분 EML-1의 생화학적 차이를 규명하기 위해 각각의 등전점(Isoelectric focusing, IEF)을 조사하는 단계;
 한국산 겨우살이 추출물 KM-110과 이로부터 분리한 단백질성분 KM-AS 분획을 시료로 사용하여 B16-BL6, Raji 및 마우스의 림프구에 처리하여 세포독성을 검증하는 단계; 한국산 겨우살이 추출물 KM-110과 단백질성분 KM-AS 및 렉틴성분 KML-C의 면역관련 세포의 유사분열물질(mitogen)에 대한 반응성 조사하는 단계; 한국산 겨우살이 추출물 KM-110과 이로부터 분리한 단백질성분 KM-AS의 사이토카인(cytokine) 유도실험을 실시하는 단계;
 한국산 겨우살이 추출물 KM-110과 단백질성분 KM-AS 및 렉틴성분 KML-C과 유럽산 겨우살이의 렉틴성분 EML-1의 IL-1 분비유도능을 서로 비교하는 단계; 한국산 겨우살이 추출물 KM-110, 렉틴성분 KML-C, 단백질성분 KM-AS에서 렉틴성분 KML-C를 제거한 나머지 단백질성분 C free-AS 및 유럽산 겨우살이로 렉틴성분 EML-1의 IL-1, IL-6, TNF- α 및 INF- γ 유도능을 조사하는 단계; 상기 렉틴성분 KML-C이 제거된 단백질성분 KM-AS의 INF- γ 유도물질을 헤파린 컬럼을 사용하여 분리하는 단계; 한국산 겨우살이 추출물 KM-110, 렉틴성분 KML-C 및 헤파린 컬럼으로 분리한 단백질 성분 KMHBP의 생체내 급성세포독성을 조사하는 단계; 한국산 겨우살이 추출물 KM-110과 렉틴성분 KML-C의 자연살해세포(Natural killer cell; 이하 NK-세포)활성화 정도를 측정하여 비특이적 면역계에 미치는 효과를 조사하는 단계; 실험종양전이 모델에서 한국산 겨우살이 추출물 KM-110과 렉틴성분 KML-C의 암전이의 예방 효과를 검증하는 단계; 실험전이 모델에서 한국산 겨우살이 추출물 KM-110과 렉틴성분 KML-C의 종양전이의 치료효과 검증 단계; 한국산 겨우살이 추출물 KM-110과 렉틴성분 KML-C의 종양전이 억제 효과를 검증하는 단계; 한국산 겨

우살이 추출물 KM-110과 렉틴성분 KML-C을 마우스에 복강주사한 후 대식세포를 수집하여
종양살해능을 측정하여 대식세포(macrophage)의 활성화능을 조사하는 단계; 한국산 겨
우살이 추출물 KM-110과 렉틴성분KML-C의 NK-세포에 의한 종양전이억제 기전 확인 단계;
생체내(

In vivo) 실험모델에서 종양의존성 혈관신생의 억제 효과 검증 단계; 자연폐암전이 (spontaneous lung metastasis) 모델에서 한국산 겨우살이 추출물 KM-110과 렉틴성분 KML-C의 KM-110 및 KML-C의 종양전이 억제 효과 검증 단계; 한국산 겨우살이 추출물 KM-110과 렉틴성분 KML-C의 면역증강 효과를 B 세포의 항체생산과 관련된 체액성 면역계에 미치는 효과로 조사하는 단계; 한국산 겨우살이 추출물 KM-110과 렉틴성분 KML-C의 T-세포 매개의 세포성 면역응답을 조사하는 단계; 한국산 겨우살이 추출물 KM-110과 렉틴성분 KML-C의 KLH 항원에 대한 세포성 및 체액성 면역반응의 증가시키는 활성 조사단계; KLH 항원과 함께 한국산 겨우살이 추출물 KM-110과 렉틴성분 KML-C으로 면역화시킨 마우스에 풋패드 종기를 유도한 후 지연성 과민반응을 조사하여 세포성 면역능 증진효과를 조사하는 단계; 한국산 겨우살이 추출물 KM-110의 세포독성 T-세포(CTL)의 활성화에 미치는 효과를 검토하여 종양백신에 대한 보조액으로서의 가능성을 조사하는 단계; 실험종양 전이모델에 X-선으로 불활성화시킨 종양백신과 함께 한국산 겨우살이 추출물 KM-110을 보조액으로 투여하여 상기 종양백신에 대한 보조액(adjuvant)으로서의 가능성을 확인하는 단계; 종양백신과 한국산 겨우살이 추출물 KM-110을 각각 단독으로 또는 동시에 마우스에 면역한 후 마우스의 림프구를 시험관에서 항원인 종양백신으로 재자극하여 유도되는 림프구의 항원에 대한 반응성을 조사하는 단계; Balb/c 마우스를 한국산 겨우살이 추출물의 렉틴성분 KML-C를 프로인트 보조액 및 항원으로 면역화시킨 후 상기 Balb/c 마우스의 비장세포와 P3U1 골수종을 융합하여 하이브리도마 세포주를 얻은 다음 이로부터 단일클론 항체를 얻는 단계; 한국산 겨우살이 추출물 KM-110로부터 얻은 렉틴성분 KML-C로부터 두 개의 렉틴물질 KML-IIU 및 KML-IIL을 분리하는 단계; 한국산 겨우살이 추출물 KM-110의 렉틴성분 KML-C과 이로부터 분리된 두 종류의 렉틴물질 KML-IIU 및 KML-IIL의

당특이성을 적혈구 응집반응과 당에 의한 응집반응 저해 실험으로 조사하는 단계; 한국산 겨우살이 추출물에 함유된 렉틴물질 KML-IIU 및 KML-IIL의 아미노산 서열을 분석하는 단계; 한국산 겨우살이 추출물에 함유된 렉틴물질 KML-IIU 및 KML-IIL의 세포독성을 유럽산 겨우살이 렉틴성분 EML-1과 비교하여 조사하는 단계; 한국산 겨우살이 추출물에 함유된 렉틴물질 KML-IIU 및 KML-IIL), 유럽산 렉틴성분 EML-1과 단일클론 항체(9H7-D10, 8B11-2C5)의 반응성을 조사하고 이 결과를 근거로하여 각 단일클론항체에 의한 각 렉틴물질의 세포독성 중화효과를 조사하는 단계; 한국산 겨우살이 추출물에 함유된 렉틴물질 KML-IIU 및 KML-IIL의 사이토카인 유도능을 유럽산 렉틴성분 EML-1의 유도능과 비교하여 조사하는 단계; 한국산 겨우살이 추출물에 함유된 렉틴물질 KML-IIU 및 KML-IIL의 종양전이 억제 활성을 세포독성과 사이토카인 유도 활성을 근거로 하여 조사하는 단계; 한국산 겨우살이 추출물 KM-110과 렉틴물질 KML-IIU 및 KML-IIL의 면역증강작용을 B형 간염 바이러스에서 병원성을 나타내는 pre-S2 부분을 이용한 항체 생산능을 조사하여 비교 실험하는 단계; 정제한 한국산 겨우살이의 렉틴물질 KML-IIU 및 KML-IIL의 아미노산 서열을 기초로 하여 디자인한 프라이머를 가지고 PCR을 수행하여 한국산 겨우살이 렉틴물질 KML-IIU 및 KML-IIL 유전자를 부분 클로닝하는 단계 및; 상기 클로닝한 한국산 겨우살이 렉틴물질 KML-IIU 및 KML-IIL 유전자의 부분 염기서열과 아미노산 서열을 자동 염기서열 분석기로 결정하는 단계; 기존의 보조액에 한국산 겨우살이 추출물 KM-110을 혼합하여 복합 보조액으로서 면역증강효과를 조사하는 단계; 숙주를 달리하여 얻은 겨우살이로부터 추출한 추출물 KM-110과 렉틴성분 KML-C의 함량 및 각각의 렉틴물질 KML-IIU 및 KML-IIL의 함량을 조사하는 단계; 여러 가지 종양세포에 대해 상기 숙주를 달리하는 겨우살이 추출물의 세포독성 효과를 시험관내에서 측정하는 단계; 헤파린 컬럼에 부착하

여 분리한 단백질 KMHP와 락틴성분 KML-C의 혼합물 KM의 면역자극효과를 조사하는 단계; 상기 혼합물 KM의 *in vivo* 내 세포독성을 조사하는 단계 및; 상기 혼합물 KM의 종양전이 억제효과를 조사하는 단계로 구성된다.

【보정대상항목】 식별번호 46

【보정방법】 정정

【보정내용】

본 실험에 사용한 겨우살이는 한국에서 서식하는 겨우살이로서 1월에 채취한 것을 사용하였다. 실험에 사용된 겨우살이는 1년 및 2년생으로서 가지의 끝에서 부터 두 마디까지의 잎, 줄기 그리고 열매를 겨우살이로부터 절단하여 증류수로 충분히 세척하여 건조시킨 다음, 진공 포장하여 추출시까지 -80°C 에서 보관하였다. 동결된 겨우살이 잎과 줄기를 세절한 후 믹서(blender)에서 다시 혼합한 후 5배 부피의 증류수로 4°C 에서 8~12시간 동안 교반하였다. 그 후 10,000rpm으로 4°C 에서 30분 동안 원심분리하여 얻은 상등액을 구멍크기(pore size)가 다른 멤브레인 필터(membrane filter)에 의해 순차적으로 여과한 후(7.2, 0.45, 0.22mm) 내액을 동결건조시켜 갈색의 분말(KM-110)을 얻었다. 한국산 겨우살이로부터 KM-110의 회수율은 약 10%였다. 이 동결 건조물은 PBS로서 10mg/mL의 농도로 조정하여 스탁 용액(stock solution)으로 만든 후, -20°C 에 저장하여 실험에 사용하였다. 한국산 겨우살이로부터 얻은 단백질 분획 조제는 70%의 포화된 암모니아 설페이트(ammonium sulphate)용액을 이용한 침전법을 이용하였다. 즉, 한국산 겨우살이를 0.15M 염화나트륨(NaCl)을 함유하는 인산염 완충용액(phosphate buffer, 이하 PBS: pH7.4)에서 KM-110의 제조와 동일한 방법으로 교반 후, 암모니아 설페이트 파우더(ammonium sulphate powder)를 첨가시켜 70%의 암모니아 설페이트 포화 용액을 만들고 4

℃에서 약하게 교반시켜 단백질 성분을 침전시켰다. 이 침전물을 PBS로 용해한 후, 동일한 버퍼에서 2일간 버퍼를 바꾸어 가며 투석시켰다. 그 후 15,000g에서 30분간 원심분리를 하여 얻은 상등액을 취하여 0.45 μ m의 멤브레인 필터에서 여과함으로써 KM-AS의 분획을 얻었고, 단백질 에세이 키트(protein assay kit: Boehringer Mannheim사)를 이용하여 단백질 정량을 한 후 -20℃에서 실험할 때까지 보관하였다. 겨우살이로부터 KM-AS의 회수율은 0.3~1.5%이다.

【보정대상항목】 식별번호 59

【보정방법】 정정

【보정내용】

도 5의 A에서 보는 바와 같이 100 μ g~1 μ g/mL의 농도로 1시간 자극 후, 새로운 배양액을 첨가하여 24시간 동안 배양한 대식세포(macrophage) 배양상등액은 대조군인 LPS의 경우와 비교하여 유효한 IL-1의 활성을 나타내었다. 이 결과에 의거하여 KM-110의 각 농도에 따른 활성을 경시적으로 검토하였다. 도 5의 B에 나타낸 바와 같이, 100 ~10 μ g/mL 농도로의 자극은, 자극 후 10시간에서는 거의 동등한 IL-1활성을 나타내었고, 정점에 도달하였지만 자극 초기단계(5시간까지)에서는 50 μ g/mL의 농도가 가장 높은 활성을 나타내었다. 한편, 500 μ g/mL 농도에서는 자극 24시간 후까지 유의할 만한 IL-1활성이 나타나지 않았으나, 1 μ g/mL의 농도에서는 자극 24시간 후에는 IL-1활성이 인정되었다. 이상의 결과로서 KM-110에 의한 IL-1의 분비유도 양식은 10~100 μ g/mL의 농도에서 가장 유효하였으며 1 μ g/mL 농도까지는 IL-1활성이 유지되는 것으로 판단되었다. IL-1의 유도과 관련된 KM-110의 활성성분을 검토하기 위하여, 그의 단백질 성분이 KM-AS에 의한 IL-1 분비유도능을 조사하였다. 본 실험에 사용된 KM-AS의 단백질의 양은 0.25mg/mL이었다. 도 5

의 C에서, 이 분획물을 100배 희석법으로 희석한 뒤, IL-1의 활성을 조사한 결과 KM-110의 단백질 성분인 KM-AS도 IL-1의 유도 활성이 있는 결과를 나타내어 KM-110에서 IL-1 유도인자(inducer)로 작용한 물질은 단백질 성분임이 확인되었다. 또, KM-AS에서 분리한 KML-C의 IL-1의 유도 활성은 도 6에 나타내었다. 결과에 나타난 바와 같이 대식세포(macrophage)의 KML-C에 의한 IL-1유도활성은 KML-C의 농도 50ng/mL부터 1ng/mL까지 유의하게 나타났으며 KML-C농도에 의존적인 경향을 나타내었다. 이상의 결과로서 겨우살이 성분들로 자극된 대식세포(macrophage) 배양상등액은 흉선 T-세포를 활성화시키는 IL-1의 활성이 있음을 바이오에세이(bioassay)에 의하여 확인하였고 그 성분은 주로 KML-C에 의하는 결과를 나타냈다. IL-1활성을 나타내는 배양상등액의 IL-1의 유도분비의 확인은 ELISA법으로 조사하였다. ELISA kit로 IL-1 에세이(assay)를 위한 시료의 대식세포(macrophage)자극농도는 바이오에세이(bioassay)에서 유효하게 IL-1활성을 유도한 농도(KM-110; 10 μ g/mL, KML-C; 10ng/mL)였고, 대조군으로 유럽산 렉틴(lectin)성분인 EML-1(10ng/mL)을 사용하였다. 도 7의 결과에 나타난 바와 같이 각 시험물질로 자극한 대식세포(macrophage)의 배양상등액 내에는 IL-1이 유도되었으며, KML-C는 KM-110의 IL-1분비유도에 있어서 가장 중요한 활성물질 중의 하나인 것으로 사료되었다. 그리고 KML-C와 EML-1의 직접비교에서 KML-C가 EML-1에 비하여 높은 IL-1 유도능을 나타내어 KML-C가 EML-1에 비하여 사이토카인 유도인자(cytokine inducer)로서 높은 활성을 가지는 것으로 사료되었다. 따라서, 마우스의 경우 KML-C에 의하여 대식세포가 IL-1을 유도분비하는 농도는 1 ~ 100ng이었고, 사람에게 적용시 100ng ~ 100 μ m이 될 것으로 추정되었다.

【보정대상항목】 식별번호 61

【보정방법】 정정

【보정내용】

대식세포(macrophage) 배양상등액을 이용하여 KM-AS, KML-C 및 EML-1, 그리고 KML-C가 제거된 단백질 분획(C free-AS)에 의한 TNF- α , IL-6 및 IFN- γ 의 분비 유도능을 조사하여 도 8에 나타내었다. 대식세포를 자극하여 각 사이토카인을 유도하기 위한 각 분획의 자극농도는 KM-AS 및 c-free-AS의 경우 5 μ l/mL, KML-C 및 EML-1의 경우는 10 μ l/mL이었다. 도 8의 결과와 같이 KM-AS, KML-C 및 C-free-AS는 대식세포로부터 IL-6 및 TNF- α 의 유도능이 확인되었고, KML-C의 활성이 EML-1에 비하여 더 높은 것으로 사료되었다. IFN- γ 의 경우, KML-C에 의한 IFN- γ 의 유도능은 없는 결과가 나타났으나, C-free-AS 분획은 KM-AS 만큼의 IFN- γ 유도 분비능이 있었다. 이 결과에서 IFN- γ 를 유도하는 물질은 렉틴(lectin)인 KML-C 분획이 아닌 다른 단백질 성분인 것으로 사료되었다. 이 결과에서 대식세포(macrophage)를 자극하여 IL-1, IL-6, TNF- α 및 IFN- γ 를 유도하는 것은 KM-110의 활성은 주로 그의 단백질 분획인 KM-AS에 의한다는 것이 확인되었다. 또, KM-AS를 구성하는 성분 중에서 IL-1, IL-6, TNF- α 의 유도는 주로 렉틴(lectin)성분인 KML-C가 관여하는 것으로 확인되었으나 IFN- γ 의 유도인자(inducer)로는 작용하지 않는 결과를 나타냈다. 따라서, KM-110은 KML-C 외에도 다른 활성성분이 함유하는 것으로 사료되었고, 따라서 KM-110의 활성성분에서 IFN- γ 를 유도하는 성분에 대하여 좀더 자세한 연구의 필요성이 요구되었고 그 결과를 실시예 7에 나타냈다.

【보정대상항목】 식별번호 63

【보정방법】 정정

【보정내용】

KM-110, KM-AS에서 유도되는 대부분의 사이토카인(cytokines)이 렉틴(lectin) 분획인 KML-C만으로도 유도되었으나 IFN- γ 의 유도제로는 작용하지 않는 것으로 실시예 6에서 확인되었기 때문에 KM-AS에서 KML-C이외의 IFN- γ 의 유도물질을 탐색하는 것이 요구되었다. IFN- γ 의 유도물질 탐색을 위한 재료물질은 도 8의 결과에 제시한 것처럼, KML-C가 제거된 KM-AS 분획인 C-free AS는 유효하게 IFN- γ 을 유도하는 활성을 나타냈기에 이 분획을 이용하였다. IFN- γ 의 유도인자(inducer)를 분리하기 위하여 헤파린 컬럼(heparin column, Pharmacia사)을 사용하였다. KML-C가 제거된 KM-AS 분획인 C-free-AS를 인산염 완충용액(phosphate buffer, 0.01M, pH7.4)에 용해시킨 후, 헤파린 컬럼(heparin column)에 적용하고 동일한 버퍼를 이용, 컬럼에 결합되지 않은 물질이 완전히 제거될 때까지 충분히 세척하였다. 세척 완료 후, 동일한 버퍼에 염화나트륨(NaCl)의 농도를 순차적으로 높이면서(10mM~1M) 컬럼에 결합된 물질을 용출하였다. 도 9는 염화나트륨 농도에 의존적으로 용출된 분획의 크로마토그램(chromatogram) 결과이다. 결과에 나타난 바와 같이 헤파린 컬럼(heparin column)으로 분리된 물질이 순수하게 분리되지는 않았지만 염화나트륨(NaCl)농도에 따른 용출 분획의 전기영동 양상(pattern)이 다른 결과가 나타났기에 헤파린(heparin)과의 친화성(affinity)이 서로 다른 특성을 지니는 물질이 용출되었다는 것을 시사하였다. 다음 실험으로서 각각의 분획이 IFN- γ 를 유도하는 활성이 있는지를 조사하였다. 헤파린 컬럼으로 분리한 각 분획을 200 ~ 5,000ng/mL의 농도로 자극하고, 그 배양상등액에 유도된 IFN- γ 를 실시예 6과 동일한 방법으로 조사하여 그

결과를 도 10에 나타냈다. 그 결과 IFN- γ 를 유도하는 활성이 있는 분획은 주로 100mM의 염화나트륨이 함유된 버퍼로 용출된 분획이었다. 따라서, INF- γ 의 유도인자(inducer)는 주로 헤파린(heparin)에 결합하는 단백질(Korean mistletoe heparin binding protein; KMHP) 성분 중에서 주로 100mM의 염화나트륨에 의하여 용출되는 분획임을 확인하였다. 따라서, 가장 유효한 면역자극 활성을 유도하기 위하여는 렉틴성분인 KML-C 외에도 헤파린 컬럼에서 100mM의 NaCl을 함유하는 버퍼의 조건에서 분리되는 KMHP(KMHP-100) 성분이 요구됨을 확인하였다. 이러한 조건을 만족케 하는 시료의 농도는 마우스에서 5 ~ 100ng의 KML-C에 100ng ~ 10 μ g의 KMHP-100이 혼합된 경우이다.

따라서, 사람에게 적용시 10 μ g ~ 10mg의 KMHP-100에 500ng ~ 100 μ g의 KML-C가 혼합된 분획을 사용할 수 있다.

【보정대상항목】 식별번호 65

【보정방법】 정정

【보정내용】

참나무에서 기생하는 겨우살이 추출물 각 분획인 KM-110, KML-C 및 KMHP의 급성독성효과를 마우스에서 조사하였다. 6주령의 Balb/c(female)에 KM-110의 경우 1.5, 1.0mg(KM-AS로 환산하면 15 ~ 10 μ g)을, KML-C의 경우 5, 2.5, 1.25, 0.62 μ g을, KMHP 중 100mM의 염화나트륨 용액에서 용출된 분획(이하 KMHP-100로 함)의 경우 100, 50, 25 μ g을 정맥주사(intravenous)하고 7일간 마우스의 생존율 및 체중을 조사하였다. 각 실험군 마우스는 각각 10마리씩 실시하였다. 실험결과, 표 1에는 생존율을 나타냈고 표 2에는 체중의 변화를 나타냈다. 즉, 표 1에서 보는 바와 같이 겨우살이 수추출물인 KM-110을 투여한 경우에는 1.5mg/마우스 그룹에서는 투여후 24시간 이내에 마우스가 모두 폐

사하였으나 그 이하의 농도인 1.0mg/마우스의 군에서는 폐사한 마우스가 없었다. KM-110의 투여 후 모두 생존한 1.0mg을 투여한 마우스의 체중변화는 표 2에 나타낸 바와 같이 투여 3일 째에 약간 감소하는 경향을 보이다가 5일 제부터 정상적인 상태로 회복되어 실험종류 시기인 7일 후에는 외형상의 이상은 발견할 수 없었다. 따라서 KM-110의 급성독성을 나타내는 LD₅₀ 값은 1.5 ~ 1.0mg/마우스(약 1.25mg/마우스)이고, KH-AS의 LD₅₀ 값은 약 12.5 μ g/마우스로 추정되었다. KML-C 분획의 경우 5 및 2.5 μ g/마우스를 투여한 그룹의 마우스는 극심한 입모 및 무기력증을 보이다가 2일내에 모두 폐사하였으며, 1.25 μ g/마우스를 투여한 그룹에서는 1일째에는 폐사동물이 없었으나 2일째나 3일째에 각각 2마리 및 1마리가 폐사는 결과를 보였다. 또 표 2에서 보는 바와 같이 체중의 변화는 1.25 μ g을 투여한 경우 마우스의 체중은 투여 3 ~ 5일에 약 5% 정도 감소하였고 발열반응에 기인되는 것으로 사료되는 입모 및 무기력증상이 보였다. 그러나 투여 6일째부터는 정상상태로 돌아와 다시 체중이 증가하는 경향을 보였다. 0.625 μ g/마우스의 경우는 정상마우스와 비교하여 어떠한 이상증상이 발견되지 않았다. 따라서 KML-C의 LD₅₀ 값은 약 1.25 μ g/kg 전후로 추정되었다. KMHP-100의 경우 100 μ g/마우스를 투여한 군에서는 투여 1일 후에 모든 마우스가 폐사하였으나 50 μ g 이하를 투여한 군에서는 체중의 감소나 다른 이상증세가 없었다. 따라서 KMHP-100의 LD₅₀ 값은 약 100 ~ 50 μ g/kg 사이로 추정되었다.

【표 1】

겨우살이 각 분획의 투여에 의한 마우스의 치사율

시료	투여량/ 마우스	날 짜 / 생존율(%)							결과 (%)
		1일	2일	3일	4일	5일	6일	7일	
KM-110	1.5mg	0	-	-	-	-	-	-	0
	1.0mg	100	100	100	100	100	100	100	100
KML-C	5 μ g	40	0	-	-	-	-	-	0
	2.5 μ g	80	0	-	-	-	-	-	0
	1.25 μ g	100	60	60	60	40	40	40	40
	0.625 μ g	100	100	100	100	100	100	100	100
KMHBP	100 μ g	0	0	0	0	0	0	0	0
	50 μ g	80	70	70	70	70	70	70	70
	25 μ g	100	100	100	100	100	100	100	100

【표 2】

각 분획의 정맥투여에 의한 체중변화

시료	투여량/ 마우스	날 짜/평균무게(g) 표준편차			
		1일	3일	5일	7일
대조군	-	20.2 \pm 0.5	20.3 \pm 0.6	20.3 \pm 0.7	20.5 \pm 0.6
KM-110	1.5mg	-	-	-	-
	1.0mg	20.0 \pm 0.8	19.8 \pm 0.6	20.0 \pm 0.8	20.1 \pm 0.9
KML-C	5 μ g	19.5 \pm 0.7	-	-	-
	2.5 μ g	19.4 \pm 0.5	-	-	-
	1.25 μ g	19.6 \pm 0.4	19.0 \pm 0.6	19.1 \pm 0.7	19.4 \pm 0.5
	0.625 μ g	20.0 \pm 0.5	19.7 \pm 0.6	20.0 \pm 0.6	20.1 \pm 0.6
KMHBP	100 μ g	-	-	-	-
	50 μ g	20.2 \pm 0.7	20.2 \pm 0.7	20.3 \pm 0.9	20.4 \pm 0.8
	25 μ g	20.5 \pm 0.7	20.5 \pm 0.8	20.6 \pm 0.8	20.6 \pm 0.9

【보정대상항목】 식별번호 66

【보정방법】 삭제

【보정대상항목】 식별번호 67

【보정방법】 삭제

【보정대상항목】 식별번호 68

【보정방법】 삭제

【보정대상항목】 식별번호 77

【보정방법】 정정

【보정내용】

【표 3】

B16-BL6 흑색종 또는 결장 26-M3.1 암세포의 정맥주사 후 생성된 폐암전이에 대한 KM-110의 예방효과.
폐암전이주(저해 %)

처 리	결장 26-M3.1			
	B16-BL6		결장 26-M3.1	
KM-110 (100 μ g/마우스)	평균치 ± 표준편차	레인지	평균치 ± 표준편차	레인지
무처리(PBS)	238 ± 33	(200 - 286)		
종양접종 4일전 투여	129 ± 30 (45.8)*	(134 - 154)	159 ± 9	(152 - 165)
종양접종 2일전 투여	72 ± 25 (69.7)**	(43 - 88)	30 ± 22 (80.4)**	(4 - 52)

주) * P<0.01; ** P< 0.001, 대조군과 비교하였을 때(by Student's two-tailed t test)

【보정대상항목】 식별번호 79

【보정방법】 정정

【보정내용】

도 13의 A와 B에서 보듯이 전신투여인 정맥 및 피하주사의 경우 5 μ g의 투여까지 유효한 종양전이 억제효과가 있었고, 특히 정맥주사에 의한 50~100 μ g의 투여는 대조군에 비하여 80% 이상 높은 전이억제 효과를 나타냈으며, 피하주사에서도 60% 이상의 종양전이 억제효과를 나타내었다. 도 13의 C와 D에서 500, 250, 50 μ g의 경구투여는 64.4, 65.8, 53.4%의 종양전이억제 효과를, 5 μ g의 경비투여 역시 종양의 전이를 유효하게 억제

(48.6%)하는 효과가 인정되었다. 점막기관으로의 투여인 경구 및 경비투여의 경우에서도 종양의 전이가 유효하게 억제되는 것은 흥미로운 사실로서, KM-110의 종양에 대한 점막 면역능을 상승시키는 활성이 있음을 강하게 시사하는 결과로 사료되었다. 경비투여의 경우 50 μ g의 농도에서 종양전이억제 효과가 나타나지 않는 것은 KM-110의 비강점막세포에 대한 직접적인 세포독성 효과에 의한 결과로 생각되었다.

【보정대상항목】 식별번호 83

【보정방법】 정정

【보정내용】

표 6에는 L5178Y-ML25 임파종(lymphoma)의 간(liver) 및 비장(spleen)으로의 종양전이에 미치는 KM-110의 영향에 관한 결과를 나타냈다. 100 μ g의 KM-110 투여는 간 및 비장으로의 임파종(lymphoma)전이를 각각 78.4% 및 58.3% 씩 유의한 전이억제력을 나타냈다. 따라서 다음 실험으로 KM-110의 항종양 전이활성을 자세히 검토하기 위하여 농도별 혹은 투여시간에 따른 항종양 활성을 검토하였다.

【보정대상항목】 식별번호 85

【보정방법】 정정

【보정내용】

표 7의 결과에 나와 있듯이 정맥 혹은 피하주사의 어떠한 경우에 있어서도 10 μ g까지의 투여까지 그리고 종양접종 후 3일까지는 유효한 종양의 전이억제 효과를 나타내었으나 5일 후의 투여는 대조군과 유의성이 인정되지 않았다. 따라서 동물실험모델에서 KM-110의 종양전이억제 치료효과를 나타내는 유효농도는 10 μ g까지이며, 종양접종 후 3일 이내의

투여로서 유효한 종양전이억제 효과를 나타내었다.

【보정대상항목】 식별번호 89

【보정방법】 정정

【보정내용】

【표 8】

마우스의 간(liver), 비장(spleen) 또는 폐암전이에 대한 KML-C의 치료효과(실험I; L5178Y-ML25 임파종 세포(lymphomacells))

겨우살이 처리			평균치 무게(g) ± 표준편차, (저해%)	
	접종일	분량	간	비장
정상적인 쥐			1.07 ± 0.1	0.09 ± 0.02
무처리	(종양 대조구)		3.54 ± 0.48	0.21 ± 0.05
KM-110	종양접종 1일 후	100μg	1.59 ± 0.22(56.5)	0.14 ± 0.02(33.3)*
KML-C	종양접종 1일 후	50ng	1.83 ± 0.84(48.3)**	0.16 ± 0.04

주)* p<0.05; **p<0.01, 종양대조군과 비교할 때(by student's two-tailed t test, compared)

【보정대상항목】 식별번호 95

【보정방법】 정정

【보정내용】

도 15의 A에서 보듯이, 100μg의 KM-110을 주사한 마우스의 대식세포(macrophage)는 KM-110을 주사하지 않은 정상 마우스의 대식세포(macrophage)에 비하여 B16-BL6 흑색종(melanoma) 종양세포주의 증식억제효과가 약 3배 정도 유의하게 높은 활성을 나타내었으며, 이 활성은 KM-110주사 2일에 최고를 나타내었고, 4일째부터는 감소하는 현상을 나타내었다. 따라서, KM-110의 투여는 생체내에서(

in vivo) 종양세포에 대항하는 대식세포(macrophage)를 활성화시키는 작용을 하는 것으로 사료되었다. 이 결과에 근거하여 KML-C의 투여에 의한 대식세포의 종양세포 살해활성 효과는 투여 2일째에 조사하였다. 도 15의 B의 결과에 있듯이 KML-C 투여 2일 후의 대식세포(macrophage)는 ^{51}Cr 으로 표지된 B16-BL6 흑색종(melanoma)의 살해능을 유효하게 증진시키는 활성이 있었다. 이 결과로 종양세포에 대한 살해기전을 가지는 대식세포(macrophage)를 활성화시키는 KM-110의 성분 역시 KML-C가 주된 활성을 가지는 것으로 사료되어 졌다. 이러한 대식세포(macrophage)의 종양 살해능은 자극에 의하여 활성화된 대식세포(macrophage)가 유도하는 $\text{TNF-}\alpha$ 또는 종양세포와의 직접 접촉에 의하여 일어나는 것으로 알려져 있다. 또, 활성화된 대식세포(macrophage)는 종양세포를 살해하는 활성산소(ROIs) 및 일산화질소(NO) 등도 분비하는 것으로 알려져 있기에 KM-110 혹은 KML-C에 의한 종양세포의 살해능은 이들 종양세포 살해물질의 유도와의 관련이 있을 것으로 사료되었다.

【보정대상항목】 식별번호 97

【보정방법】 정정

【보정내용】

여러 연구에서 NK-세포는 종양의 성장 및 전이를 억제한다는 것은 이미 증명되어 있으며 KM-110 및 KML-C를 투여한 마우스의 비장세포가 YAC-1 세포를 살해하는 NK-세포의 활성을 증진시키는 효과가 있다는 것은 시험관내(

in vitro) 실험에서 이미 확인하였다(실시에 9). 시험관내(*in vitro*)에서 KM-110 또는 KML-C에 의한 NK-세포 활성화는 시료투여 1-3일째에 정점에 도달하였으며 이것은 생체내에서(*in vivo*) 시험물질에 의한 종양전이 치료 효과가 종양의 접종 3일 이내에 본 발명 물을 처리하였을 때 유효한 종양전이의 억제효과를 나타낸 것과 일치하는 경향을 나타내었다. 따라서 KM-110에 의한 항종양 전이효과가 NK-세포의 활성화에 기인되는 현상인지를 *in vivo*에서 유도되는지에 대한 증명이 요구되기에 실험동물에 anti-asialo-GM1 항체를 투여하여 NK-세포를 미리 주사하여 NK-세포가 제거된 마우스를 이용하여 결장(colon) 26-M3.1 폐암(lung carcinoma)의 전이에 미치는 KM-110의 효과를 조사하였다. 도 16의 결과에서 보듯이 생체내에서(*in vivo*) anti-asialo-GM1 항체를 미리 처리한 마우스의 경우, 정상마우스에 비하여 전이된 종양의 수가 2배 이상 증가한 결과를 나타내어 anti-asialo-GM1 항체에 의한 NK-세포의 불활성화가 생체내에서(*in vivo*) 유도되었음을 입증되었다. 정상 마우스에서 종양의 접종 2일전에 KM-110을 처리한 경우는 도 13의 결과와 비슷한 약 80% 이상의 종양전이억제 효과를 나타내었으나 NK-세포가 제거된 마우스의 경우 KM-110의 처리에도 불구하고 대조군과 비슷한 수준의 종양전이가 유도됨으로, anti-asialo-GM1을 처리하여 NK-세포가 제거된 마우스에서는 정상마우스의 경우와는 달리 KM-110에 의한 종양전이 억제 효과가 없어지는 결과가 나타났다. 따라서 KM-110에 의한 종양전이억제 효과는 종양세포에 대한 NK-세포의 활성화가 직접 관여되는 것으로 증명되었다. KML-C의 경우도 생체내에서(*in vivo*) 유도한 비장세포(splenocytes)가 종양세포에 대한 NK-세포 활성이 증진된 결과를 나타낸 바 KM-110과 동일한 기전에 의한 항종양전이 활성이 일어나는 것으로 사료된다.

【보정대상항목】 식별번호 100

【보정방법】 정정

【보정내용】

【표 10】

생체내에서 종양의존성 혈관신생의 형성과 종양성장에 대한 KM-110의 저해효과			
처리	치료주사날짜	원발소의 크기	종양유도 혈관의 수
무처리	-	7.0±0.6	9.8±1.1
KM-110	종양접종 1일 후	5.4±0.4**	5.5±1.3**
	종양접종 3일 후	5.3±0.6*	6.7±1.2*
	종양접종 5일 후	6.0±1.0	8.3±2.5
주) * p<0.05, ** p<0.01, 대조군과 비교할때(by Student's two-tailed t test)			

【보정대상항목】 식별번호 101

【보정방법】 정정

【보정내용】

KM-110의 종양의존성 혈관신생 억제 효과는 종양의 이식 3일까지 유효하였고, KM-110 10 μ g의 투여까지도 유사한 결과를 나타내었다. KM-110에 의한 혈관신생 억제효과와 실험 동물 전이모델에서의 종양전이 억제효과를 연관시켜보면, 두 경우에 있어서 KM-110의 투여량 및 투여시기는 각각 100 ~ 10 μ g 및 종양의 이식 3일째까지로 유효한 종양의존성 혈관신생 억제효과를 나타냄으로서 항종양 활성을 나타내는 KM-110의 유효량 및 투여시기가 일치하는 결과를 나타냈다. KM-110의 종양의존성 혈관신생 및 종양증식 억제 효과를 좀더 자세히 검토하기 위하여 종양이식 3일 후에 KM-110(100 μ g, i.v.)을 투여 후, 매일 혈관신생 및 종양의 증식을 대조군과 비교하면서 검토한 결과 KM-110은 혈관신생 및 종양의 증식을 종양이식 8일째까지 유효하게 억제한 결과를 나타냄으로서 KM-110의 혈관신

생 및 종양의 증식 억제 효과를 확인할 수 있었다(도 17). 이 결과는 종양의 치료 목적으로 KM-110의 연투를 실시할 경우, 5일 간격의 투여는 실험동물 모델에서 항종양전이 효과가 유도될 수 있다는 것을 암시하였고, KM-110에 의한 종양전이 억제효과는 종양의 존성 혈관 신생이 억제됨으로 유도되는 활성임을 강하게 암시하였다.

【보정대상항목】 식별번호 103

【보정방법】 정정

【보정내용】

KM-110의 1차 종양(primary tumor)의 증식 및 전이에 미치는 치료효과의 검토는 B16-BL6 흑색종(melanoma) 세포주를 이용한 자연전이모델을 이용하였다(표 11). 결과에 나타난 바와 같이 종양을 이식한 담암숙주(tumor-bearing mice)의 경우에서 1차 종양을 제거하기 전에 KM-110(100 μ g/mouse)의 3일 간격으로의 5회 투여는 1차 종양의 증식 및 종양의 전이를 유효하게 억제하였으며, 1차 종양을 제거 후, 동일한 시간 간격으로 총 5회 투여의 경우에서도 유효한 종양전이 억제 효과를 나타내었다. 그리고 1차 종양의 제거 전 후의 총 10회의 투여경우에서도 유효한 종양의 증식 및 전이억제 효과를 나타내었기에 종양에 대한 KM-110의 치료효과를 확인할 수 있었다. 종양의 자연전이 모델에서 KM-110의 종양에 대한 치료효과는 KM-110의 종양세포에 대한 직접적인 세포독성 효과 및 대식세포(macrophages)로부터의 사이토카인(cytokines)의 유도와 그에 의한 종양의존성 혈관신생의 억제효과를 포함하여, 종양에 대항하는 시토틱 대식세포(cytolytic macrophages), NK-세포 및 종양세포에 대한 세포독성 T-세포(CTL)의 활성화 등 종양에 대한 숙주의 면역능이 증진되어 나타나는 결과로 사료되었다. 그러나 50ng의 KML-C를 투여 할 경우에는 종양의 원발소(primary tumor)는 대조군에 의하여 유효하게 증식이 억

제되었으나 전이암의 경우에는는 유효한 결과를 나타내지 못했다. 따라서 겨우살이를 종양의 치료 목적으로 사용할 경우 렉틴(lectin) 성분인 KML-C는 KM-110에서 가장 중요한 활성성분으로 인식되지만 KM-110 만큼의 성적을 나타내지 못하는 경향을 보였기에 KM-110에는 KML-C 외에도 실시예 7의 헤파린 결합물질(KMHBP) 등 다른 활성 성분이 관여되는 것으로 사료되었다.

【보정대상항목】 식별번호 109

【보정방법】 정정

【보정내용】

KM-110 및 KML-C에 의한 T-세포 매개의 세포성 면역 응답을 조사하기 위하여 시험관내에서(

in vitro) KLH 항원에 대하여 미리 감작된 림프구(lymphocytes)의 분화 에세이 (proliferation assay)를 실시하였다. 상기 실시예 17에서 마우스에 KLH를 단독 혹은 100 μ g의 KM-110 및 20ng의 KML-C 보조액(adjuvant)을 각각 혼합하여 피하주사로 2회 면역하여 항체의 역가가 가장 높게 상승한 5주째에 마우스로부터 비장을 적출한 다음 시험관내에서(*in vitro*)에서 KLH를 넣고 3일간 재자극하였다. 도 20의 결과에 나타나 있듯이 KM-110 혹은 KML-C를 동시에 주사한 마우스 그룹(group)의 비장세포는 KLH 단독 주사한 마우스의 비장세포에 비하여 항원으로 사용한 KLH에 대하여 유효한 세포의 분화 (proliferation) 활성을 나타내었으며, 이 활성은 시험관내에서(*in vitro*) 재자극하는 KLH의 농도에 의존하는 경향을 나타내었다. 이 결과로서 KM-110 및 KML-C는 항원 KLH에 대응하는 T-세포의 면역응답능을 증가시키는 활성이 있어 실시예 17의 결과를 지지해 주었다. 따라서 KM-110 혹은 KML-C는 종양 및 바이러스 감염에 대해서 효과적인 방어를 위한 항원특이적인 세포성 면역능을 유도하게 하는 백신(vaccine)에 대한 보조액 (adjuvant)으로서의 응용 가능성이 있을 것으로 사료되었다.

【보정대상항목】 식별번호 111

【보정방법】 정정

【보정내용】

KLH 항원에 대한 보조액(adjuvant)으로서의 KM-110 혹은 KML-C의 효과는 T 헬퍼 세포 서브유닛(T helper cell subunits)로부터 분비되는 사이토카인(cytokine)에 의한 것으로 사료되었기에, KLH에 감작된 마우스의 비장세포 배양상등액을 이용하여 체액성 면역 기구를 조절하는 Th-세포의 Th1 및 Th2 세브셋(subsets)유래의 사이토카인(cytokines)인 IL-2 및 IL-4의 유도 여부를 ELISA 키트(Kit)를 이용하여 조사하였다(도 21). 결과에

1019990030638

나타난 바와 같이 대조군인 PBS를 투여한 마우스의 경우, 두 사이토카인(cytokines)의 경우 모두에서 검출한계 이하의 사이토카인(cytokine)활성을 나타내었으나 항원 KLH에 보조액(adjuvant)으로서 KM-110 혹은 KML-C를 동시에 면역한 경우는 KLH 단독의 경우에 비하여 IL-2 및 IL-4 등 2가지 형(type)의 사이토카인(cytokine) 대조군에 비하여 모두 2배 이상 증가된 사이토카인(cytokine)이 유도되었다.

이 결과에서 KM-110 및 KML-C는 항원에 대한 세포성 및 체액성 면역 반응을 유도하는 두가지의 타입(type)의 사이토카인이 유도됨으로 항체 생산뿐 아니라 세포성 면역계를 증진시키는 활성이 있을 것으로 기대되었다.

【보정대상항목】 식별번호 113

【보정방법】 정정

【보정내용】

지연성과민반응(delayed type hypersensitivity; 이하 DTH)은 주로 항원에 의하여 활성화되어진 T-세포가 여러 가지 사이토카인(cytokines)을 유도하게 되고, 이로 인하여 대식세포(macrophage) 등의 비특이적 염증세포들이 항원이 침입한 부위에 침윤되어 항원에 대항하는 숙주의 세포성 면역 반응으로 알려져 있기에 KM-110 및 KML-C의 세포성 면역 반응에 미치는 효과를 생체내에서(*in vivo*) 지연성과민반응을 이용하여 조사하였다. 지연성과민반응 측정은 항원으로 미리 감작시킨 마우스의 풋패드(footpad)에 항원을 s.c.로 주사 후 유도되는 풋패드 종기(footpad swelling)를 조사하였다. 도 22의 결과에 나타나 있듯이 100 ~ 10 μ g의 KM-110 및 50ng의 KML-C를 항원 KLH와 함께 면역한 마우스는 항원 단독 면역된 마우스에 비하여 풋패드 종기(footpad swelling)가 증가되는 결과를 나타내었다. 이 결과로서 KM-110 및 KML-C는 항원 KLH에 대한 T-세포의 분화활성

(proliferating activity)과 같은 세포성 면역능을 증진시키는 효과가 있는 것으로 사료되었다.

【보정대상항목】 식별번호 123

【보정방법】 정정

【보정내용】

체내에서 항원에 대하여 감작된 T-세포는 동일한 항원에 의한 2차 자극에 의해 활성화되어 체액성 및 세포성 면역반응을 급속히 유도하게 되며, 이때 면역증강물질은 이상의 면역반응을 증진시키는 역할을 하게 된다. 표 12의 결과에서 KM-110은 종양백신에 대한 보조액(adjuvant) 활성 결과를 나타내었기 때문에, 종양백신과 100 μ g의 KM-110을 각각 단독으로 또는 동시에 마우스에 면역한 후, 마우스의 림프구를 시험관에서(*in vitro*) 항원인 종양백신으로 재자극(restimulation)하여 유도되는 림프구의 항원에 대한 반응성을 조사하였다. 도 24의 결과에서, 림프구를 시험관(*in vitro*)에서 항원으로 재자극한 결과, 항원 단독처리구 면역에 비하여 KM-110을 항원과 동시에 면역한 마우스의 림프구가 항원에 대해 유의적으로 높은 반응성을 나타냈고, 그 반응성은 항원과 반응하는 비장세포의 농도(S/R ratio)에 의존적이었다. 또한 림프구의 종양백신에 대한 활성화는 자극원인 종양백신 농도에 의존적인 경향을 나타내었으며 종양백신만 투여한 마우스의 림프구는 정상마우스에 비하여 유효한 림프구의 활성화를 나타내지 않았다. 이 결과로 KM-110은 종양백신만으로는 잘 유도되지 않는 면역반응을 증진시키는 보조액(adjuvant)활성이 있는 것으로 사료되었으므로, 표 12의 KM-110에 의한 종양전이의 특이적인 억제효과는 KM-110의 종양항원 특이적인 면역기능의 활성화에 의한 결과로 생각되었다.

【보정대상항목】 식별번호 125

【보정방법】 정정

【보정내용】

KML-C에 대한 단일클론 항체의 생산을 위해서 Balb/c 마우스에 PBS에 용해된 300ng/100 μ l의 KML-C에 동량의 완전한 프로인트보조액(complete Freund's adjuvant)을 유화시켜 복강에 면역시켰다. 14일 후에 동량의 항원을 불안정한 프로인트보조액(incomplete Freund's adjuvant)에 유화시켜 1회 더 면역시켰다. 최종 면역 10일 후에 면역한 마우스로부터 소량의 혈액을 채취하여 혈청을 얻은 후, 항원을 고정시키는 indirect ELISA로 항체의 역가를 확인 후, 항원(100ng)만으로 복강 내에 추가 항원 자극 증강법 주사(booster injection)를 하였다. 최종면역 1주일 후에 KML-C를 면역한 Balb/c마우스의 비장세포와 P3U1 골수종을 PEG를 이용하여 융합한 후, HAT배지로 하이브리도마(hybridoma)를 선별한 후, KML-C에 대한 항체를 생산하는 하이브리도마(hybridoma) 세포를 ELISA로 선택하고 96 웰 플레이트(well plate)에서 웰(well)당 1개의 하이브리도마(hybridoma)가 되도록 분주(cloning)하고 콜로니(colony)를 형성하며 성장할 때까지 배양하였다. 콜로니(colony)를 형성하며 성장한 하이브리도마(hybridoma)의 배양상등액을 ELISA로 측정하여 KML-C에 대한 항체를 생산하는 하이브리도마(hybridoma)를 선별(screening)하였으며, 이러한 클로닝(cloning)과 스크리닝(screening)을 2회 더 반복하여 KML-C에 대한 단일클론 항체를 생산하는 하이브리도마(hybridoma)세포를 선택하였다. 항체를 대량 생산 하기 위하여 프리스탄(pristane)을 주입한 마우스의 복강에 하이브리도마(hybridoma)세포를 주사하여 복수증 액체(ascitic fluid)를 얻었으며, 항체의 정제를 위하여 복수증 액체(ascitic fluid)를 단백질-G 친화칼럼(protein-G affinity column, Phamacia사)에 적용

하여 항체를 분리하였다. 정제된 단일클론항체 중에서 KML-C와 특이적으로 반응하는 항체와 유럽산의 렉틴성분의 EML-1과 교차반응하는 항체를 선별하기 위하여 ELISA를 실시하였다. 먼저, KML-C 혹은 EML-1을 ELISA 플레이트(plate) 각 웰(well)에 2 μ g/mL의 농도로 코팅(coating)시키고 BSA를 이용 블라킹(blocking)시킨 후, 양성반응을 나타내는 하이브리도마(hybridoma)의 복수를 넣고 반응 후, 발색을 위하여 HRP가 결합(conjugation)된 2차 항체를 첨가하였다. 그후 기질로서 TMB(Sigma사)를 이용하여 발색 후, 450nm에서 흡광도를 측정하였다. 도 25에 나타난 바와 같이 ELISA에 의한 항체의 특이성 실험결과, 9H7-D10은 KML-C 특이적으로 반응하는 항체로 판명되었고, 8B11-2C5의 경우는 KML-C 및 EML-1과 높은 교차 반응성을 나타내었다. ELISA에 의한 교차반응의 실험결과, 각 항체의 항체 역가를 ELISA에서 흡광도(O.D)값이 NSB(non-specific binding)보다 현저히 높은 흡광도값, 즉 0.5이상을 나타내는 복수의 희석치로 나타낼 때, 9H7-D10과 8B11-2C5 항체는 각각 5만 및 10만 이상의 높은 항체 역가를 나타냈다. 그외에 KML-C에 대하여 양성반응을 나타내는 항체는 8E12-3E9 등 여러종류가 있었다. 이들 생산된 항체의 서브타입(subtype)을 결정한 결과 9H7-D10 및 8B11-2C5는 IgG1형이었고 8E12-3E9는 IgM형이었다. 이들 3가지 항체를 이후 렉틴의 분리 및 분획을 위한 실험에 적용키로 하였다.

【보정대상항목】 식별번호 127

【보정방법】 정정

【보정내용】

ELISA에 의한 항체의 특성조사 결과 9H7-D10 항체는 EML-1과의 교차반응 없이 KML-C와 특이적으로 반응하는 결과를 얻었기에, 신속하고 정제된 KML-C로부터 두개의 렉틴 성분의 분리를 위하여 9H7-D10항체를 제조회사의 프로토콜에 따라 HiTrp NHS 활성 친화

컬럼(activated affinity column, Pharmacia Boitech사)에 고정시킨 면역-친화성 컬럼 (immuno-affinity column)을 제조하였다. 우선 평형버퍼(PBS, pH 7.4)로 컬럼을 평형시키고 KML-C를 컬럼(column)에 통과시키고 PBS로 용출되는 분획과 용출버퍼(elution buffer)인 pH2.7의 글라이신-염산 완충용액(glycine-HCl buffer)에 의하여 용출되는 분획을 수집하였다. 컬럼(column)을 통과하는 버퍼의 용출속도는 1mL/2분으로 실시하였다. 각 용출물질의 순도 및 분자량 결정은 10% SDS-폴리아크릴아미드(SDS-polyacrylamide) 전기영동으로 조사하였으며 대조군으로는 KML-C 및 EML-1을 사용하였다. 도 26의 결과에 나타난 바와 같이 9H7-D10 항체가 고정된 면역-친화성 컬럼을 이용하여 KML-C로부터 두 개의 분획을 분리할 수 있었다. 실시예 2에서 전기영동한 결과에 따라 그 중 분자량이 큰 분획을 KML-IIU, 작은 분획을 KML-IIL로 명명하였다. 각 분획을 머캅토에탄올(mecaptoethanol)이 함유된 환원상태에서 전기영동을 실시한 결과 KML-IIU와 KML-IIL은 각각 서로 다른 분자량을 가지는 두 개의 체인(chain)이 이황화물(disulfide)이 결합한 헤테로다이머(heterodimer)형태로 구성됨을 확인하였다. 즉, KML-IIU는 33.2KD와 28.6KD의 분자량을 가지는 단백질 밴드로 구성되는 61.8KD의 성분이고, KML-IIL은 31KD 및 25.5KD의 단백질로 구성되는 56.4KD의 물질로 확인되었다. 이들 구성 단백질은 기 발표된 유럽산 겨우살이의 3가지 렉틴(lectin) 성분(ML-I, -II, -III)의 구성 단백질의 분자량에서 명백한 차이를 나타냈다.

【보정대상항목】 식별번호 136

【보정방법】 정정

【보정내용】

분리한 한국산 겨우살이 렉틴의 활성조사로서 우선 유럽산 겨우살이 렉틴(EML-1)을 대

조군으로 하여 다양한 세포주에 대한 세포독성 효과를 시험관내에서(*in vitro*) 관찰하였다. 먼저 각각의 세포주 일정량을 96 웰 플레이트(well plate)에 넣고 다양한 농도의 렉틴을 첨가하고 48시간 후에 XTT법에 의한 세포의 성장을 조사하여 각 종양세포주의 성장을 50% 억제한 시료의 농도(ED₅₀)를 표 16에 표시하였다. 그 결과 대부분의 렉틴들은 B16-BL6 흑색종(melanoma), Meth A 섬유육종(fibrosarcoma) 세포주에 비교적 높은 저항성을 나타낸 반면, 3LL 암(carcinoma), Raji 임파종(lymphoma)은 비교적 높은 감수성을 나타내어 종양세포에 대한 일부 특이성이 있는 것으로 사료되었다. 또한 대부분의 종양세포에 있어서 KML-C의 세포독성 효과는 유럽산 렉틴보다 강한 것으로 나타났으며 세포주에 따라서는 10배 이상 높은 세포독성 효과를 나타내었다. 결장(colon)26-M3.1 암(carcinoma), B16-BL6 흑색종(melanoma) 및 L1210 백혈병(leukemia) 세포주에서 KML-IIU 및 KML-II L의 세포독성 효과를 비교한 결과 모든 경우에서 KML-II L이 KML-IIU에 비하여 비교적 높은 세포독성 효과를 나타내었다.

【보정대상항목】 식별번호 139

【보정방법】 정정

【보정내용】

준비된 단일클론항체 중에서 KML-C와 EML-1에 대하여 높은 반응성을 나타낸 9H7-D10, 8B11-2C5 항체를 이용한 sandwich ELISA로서 각 렉틴(lectin)과 단일클론 항체의 교차반응을 조사하였다. 각 렉틴(lectin)과 교차반응을 가지며 IgM 타입인 8E12-3E9 항체를 코팅(coating)하고, 여러 농도로 희석된 KML-IIU, KML-II L 및 EML-1을 각각 반응시켰다. 그 후 과요오드산염(periodate)법으로 9H7-D10과 8B11-2C5 항체에 HRP가 결합(conjugation)된 접합체(conjugate)를 첨가하여 각 렉틴(lectin)과 단일클론 항체와의

반응성을 조사하였다. 도 27의 결과에 나타난 바와 같이 9H7-D10 항체는 KML-II L 및 EML-1과의 교차반응 없이 KML-II U에 특이적인 반응을 보였다. 한편 8B11-2C5 항체는 KML-II U, KML-II L 및 EML-1의 모든 렉틴과 교차반응을 나타냈다. 이 결과를 근거로 하여 각 단일클론 항체에 의한 각 렉틴(lectin) 성분의 세포독성 중화효과를 조사하였다(도 28). 도 28에 나타난 바와 같이, 9H7-D10 항체는 KML-II U에 대해서만 세포독성 중화효과가 나타난 반면, 8B11-2C5 항체는 KML-II U, KML-II L 및 EML-1의 세포독성을 중화하는 활성이 있었다. 이 결과로서 한국산의 KML-II U는 KML-II L 및 유럽산의 EML-1과는 항원결정기(epitope)를 달리하는 서로 다른 구조를 가지는 물질임이 명백해 졌다. 한편, 8B11-2C5 항체는 한국산 및 유럽산의 모든 렉틴(lectin)과 교차반응을 나타냈다. 따라서 KML-II U 및 유럽산 렉틴(lectin)인 EML-1은 또한 서로 같거나 상당히 유사한 항원 결정기를 동시에 함유하는 것으로 생각되었다. 그러나 KML-II L은 EML-1과는 당 특이성 및 B-체인(B-chain)의 아미노산 서열(amino acid sequence)에서 상이성이 있고 *in vitro*에서 종양세포독성 측정결과 EML-1에 비하여 약 10배 이상 높은 활성을 나타내기에 KML-II L과 EML-1은 활성면에서 상당한 차이가 나는 렉틴 성분으로 사료되었다.

【보정대상항목】 식별번호 151

【보정방법】 정정

【보정내용】

【표 17b】

한국산 겨우살이 렉틴, 유럽산 겨우살이 렉틴 그리고 다른 연관된 렉틴의 서열비교.

<A 체인>																																	
C1	-	I	E	E	L	I	Q	S	V	S	A	L	-	-	I	Y	P	G	G	-	-	-	S	T	R	A	Q	A	R	S			
EMLA	-	I	D	Q	L	I	Q	S	V	T	A	L	-	-	I	F	P	G	G	-	-	-	S	T	R	T	Q	A	R	S			
RTA	P	L	E	E	A	I	-	-	-	S	A	L	Y	Y	Y	S	Y	G	G	T	Q	L	P	T	L	-	-	A	R	S			
ABA	A	L	T	H	G	T	-	-	-	S	F	F	-	-	R	S	-	G	G	N	D	N	E	E	K	-	-	A	R	T			
C2											A	R	F	N	P	I	X	W	R	L	R	R	Q	-	I	N	S	G	E	S			
C1	L	I	I	L	I	Q	M	I	S	E	A	A	R	F	N	P	I	F	W	R	-	A	R	Q	Y	I	N	S	G	E	S		
EMLA	I	L	I	L	I	Q	M	I	S	E	A	A	R	F	N	P	I	L	W	R	-	Y	R	Q	Y	I	N	S	G	A	S		
RTA	F	I	I	C	I	Q	M	I	S	E	A	A	R	F	Q	Y	I	E	G	E	-	M	R	T	R	I	R	Y	N	R	R		
ABA	L	I	V	I	I	Q	M	V	A	E	A	A	R	F	R	Y	I	S	N	R	-	V	R	V	S	I	Q	T	G	T	A		
C2	S	S	P	P	N	Y	M	L	E	L	E	T	S	W	G	R	Q	S	T	Q	V	Q	Q	S	K	-	D	G	I	F			
C1	F	L	P	D	M	Y	M	L	E	L	E	T	S	W	G	Q	Q	S	T	Q	V	Q	Q	S	T	-	D	G	V	F			
EMLA	F	L	P	D	V	Y	M	L	E	L	E	T	S	W	G	Q	Q	S	T	Q	V	Q	H	S	T	-	D	G	V	F			
RTA	S	A	P	D	P	S	V	I	T	L	E	N	S	W	G	R	L	S	T	A	I	Q	E	S	N	Q	G	A	-	F			
ABA	F	Q	P	D	A	A	M	I	S	L	E	N	M	W	D	N	L	S	R	G	V	Q	E	S	V	Q	D	T	-	F			
C2	N	T	Q	I	R	L	-	Q	I	S	A	G	M	F	-	V	-	T	S	X	N	V	R	D	V	-	I	-	-	S			
C1	N	N	P	F	R	L	-	G	I	S	T	G	M	F	-	V	-	T	L	S	N	V	R	D	V	-	I	-	-	A			
EMLA	N	N	P	I	R	L	-	A	I	P	P	G	M	F	-	V	-	T	L	T	N	V	R	D	V	-	I	-	-	A			
RTA	-	-	-	-	-	A	S	P	I	Q	L	Q	R	R	-	N	G	S	K	F	S	V	Y	D	V	S	I	L	I	P			
ABA	P	N	Q	V	T	L	T	N	I	R	N	E	P	V	I	V	D	S	L	S	H	P	T	-	V	-	-	-	-	A			
C2	S	L	A	I	M	L	F	E	C	S	G	R	P	F	S	S																	
C1	S	L	A	I	M	L	F	V	C	R	D	R	P	S	S	S																	
EMLA	S	L	A	I	M	L	F	V	C	G	E	R	P	S	S	S																	
RTA	I	I	A	L	M	V	Y	R	C	A	P	P	P	S	S	Q	F																
ABA-	V	L	A	L	M	L	F	V	C	N	P	P	P	P	N																		

【표 17c】

한국산 겨우살이 렉틴, 유럽산 겨우살이 렉틴 그리고 다른 연관된 렉틴의 서열비교.

<링커>																													
C2			L	D	H	P	S	P	L	L	L	R	S	V	V	D	A	A	N										
C1			D	V	R	Y	W	P	L	V	I	R	P	V	L	E	N	S	G	A	V								
EMLA																													
RTA						S	-	L	L	I	R	P	V	V	P	N	F	N											
ABA			A	N	Q	S	P	L	L	I	R	S																	

【보정대상항목】 식별번호 152

【보정방법】 삭제

【보정대상항목】 식별번호 153

【보정방법】 정정

【보정내용】

【표 17d】

한국산 겨우살이 렉틴, 유럽산 겨우살이 렉틴 그리고 다른 연관된 렉틴의 서열비교.

<B 체인>																				
IL		D	V	T	C	T	A	S	E	P	T	V	R	I						
C2		D	V	T	X	T	X	S	E	P	T	V	R	I	V					
C1	D	D	V	T	C	T	A	S	E	P	T	V	R	I	V					
EMLB	D	D	V	T	S	S	A	S	E	P	T	V	R	I	V	G	R	N	G	M
RTB	A	D	V	C	M	D	P	-	E	P	I	V	R	I	V	G	R	N	G	M
ABB	S	K	I	C	S	S	R	Y	E	P	T	V	R	I	G	G	R	D	G	M

실시에 35: 겨우살이를 함유하는 복합 보조액(adjuvant)의 면역증강 효과

【보정대상항목】 식별번호 154

【보정방법】 삭제

【보정대상항목】 식별번호 155

【보정방법】 정정

【보정내용】

본 실험은 이미 사용되고 있는 보조액(adjuvant)에 KM-110을 혼합하여 새로운 보조액 처리방안(adjuvant formulation)을 구하고자 실시하였다. 실험결과 KM-110에 의한 시너지 활성(synergistic activity)이 유도된다면 다양한 형태의 보조액(adjuvant)으로서의 개발가능성을 시사한다고 사료된다. 일반적으로 보조액(adjuvant)은 여러 항원에 대하여 활성을 나타내어야 하기에 본 실험에서는 가축에서 폐렴을 유도하는 원인균 중의 하나인

마이코플라스마(mycoplasma)를 사용하였다. 항체 역가의 조사는 실시예 32과 동일한 방법으로 하였고 실험결과는 도 35에 나타났다. 실험에 사용한 기존의 보조액(adjuvant)은 20%의 알루미늄 히드록시드(aluminum hydroxide)와 3%의 오일(oil)인 ASA25를 사용하였다. 실험결과 100 μ g의 KM-110과 알루미늄 보조액(alum adjuvant)은 실시예 32의 결과와 유사한 형태로서 유효한 항체생산 증진효과가 인정되었으며, 오일(oil)만으로서의 면역은 KM-110과 알루미늄(alum)에 비하여는 비교적 낮은 항체생산성을 유도하였다. 추가 항원 자극 증강법(booster) 면역 2주 후의 결과에서 기존의 보조액(adjuvant)인 알루미늄(alum) 보조액과 ASA25를 혼합하여 면역시킨 결과는 각 보조액(adjuvant) 단독 면역의 경우에 비하여 약 5배정도 높은 역가를 나타내는 항체가 유도됨으로서 기존의 보조액(adjuvant)을 혼합한 경우, 단독 면역방법의 결과에 비하여 우수한 상승효과가 나타났다. 이 경우에서 KM-110이 혼합한 결과 보조액(adjuvant) 단독 면역의 경우에 비하여 약 10배 정도의 높은 역가를 가지는 항체가 생산되었다. 따라서 KM-110을 기존의 보조액(adjuvant)에 혼합한 경우에서도 KM-110은 높은 역가를 나타내는 항체를 생산하는 활성이 있기에 KM-110이 포함되는 새로운 형태의 보조액(adjuvant)이 개발될 수 있는 가능성을 제시하였다.

【보정대상항목】 식별번호 166

【보정방법】 정정

【보정내용】

이 결과가 나타내는 것은 KM 분획은 렉틴으로는 유도되지 않는 IFN- γ 의 유도능을 KMHBP 분획이 보완한 것으로 사이토카인의 유도능 측면에서는 조분획물인 KM-110 혹은 KM-AS의 유사한 활성을 나타냈다. 그리고 KM 분획은 정상세포에 대한 직접적인 세포독성

효과를 7배 이상 낮추는 결과를 야기함으로 안전성 측면에서 KM-AS 혹은 KM-110을 개선한 분획으로 인정되었다.

【보정대상항목】 식별번호 168

【보정방법】 정정

【보정내용】

KM 분획의 생체내 급성독성 효과를 실시예 8과 동일한 방법으로 측정하였고 표 21에 나타냈다. 대조군으로는 KM-110내의 단백질 분획인 KM-AS를 사용하였다. 표 21의 결과에서 보듯이 KM-AS의 LD₅₀ 값은 10 ~ 15 μ g/마우스였으나 KM 분획의 경우는 75 μ g/마우스 정도에서 LD₅₀ 값이 나타나는 결과를 보였다. 이 현상을 좀더 자세히 고찰하면 마우스당 KM 분획을 100 μ g 투여한 결과 6시간 이내에 급사한 경우는 없었으며 과다한 염증 사이토카인의 유도에 기인하는 것으로 추정되는 발열반응에 의한 입모 및 무기력증이 관찰되었다가 72시간 이내에 모두 폐사하였다. 그리고 LD₅₀ 값에 가까운 75 μ g/kg이 투여군에서 생존한 마우스의 경우 투여 5일까지도 입모 및 무기력 현상이 관찰되었으며 그 이후에 회복하였다. 그러나 KM-AS 분획의 폐사현상은 KM 분획과는 다르게 15 μ g/kg의 고농도에서는 투여 후 즉시 무기력증상을 보이다 24시간 이내에 폐사하였고 모두 생존한 10 μ g/kg 투여군의 경우 1 ~ 3일 까지 약간의 무기력증 및 입모현상이 관찰되다 그 이후 정상으로 돌아왔다. 이 결과에서 KM-110의 단백질 분획인 KM-AS에는 마우스에 치명적인 독성효과를 나타내는 물질이 존재하는 것으로 생각되었다. 그러나 헤파린 컬럼으로 분리된 KMHBP-100 및 KML-C로 구성되는 KM 분획의 경우 급사현상은 관찰되지 않는 것으로 보아 헤파린 컬럼으로의 분리에 의해 이 물질은 제거되는 것으로 사료되었다.

【보정대상항목】 식별번호 169

【보정방법】 정정

【보정내용】

【표 21】

KM 분획의 정맥투여에 의한 치사율

시료	용량	날짜/생존율(%)							결과 (%)
		1일	2일	3일	4일	5일	6일	7일	
KM-AS	15 μ g	0	-	-	-	-	-	-	0
	10 μ g	100	100	100	100	100	100	100	100
KM	100 μ g	40	20	0	-	-	-	-	0
	75 μ g	80	40	40	40	40	40	40	40
	50 μ g	100	100	100	100	100	100	100	100
	25 μ g	100	100	100	100	100	100	100	100

【보정대상항목】 식별번호 173

【보정방법】 정정

【보정내용】

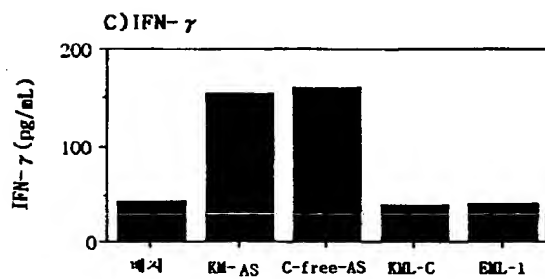
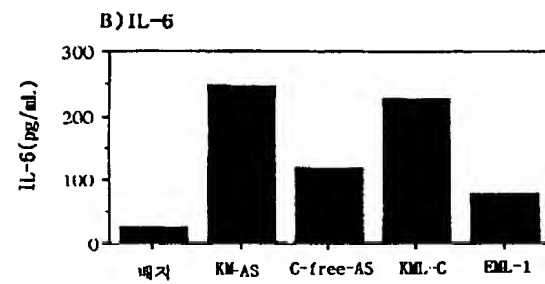
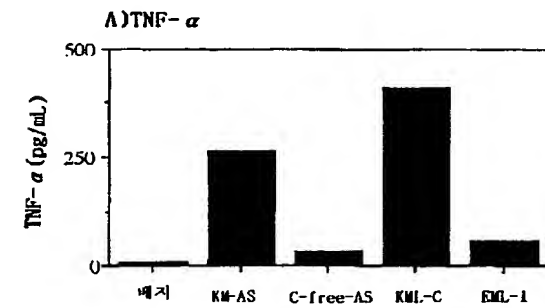
이상, 실시예에서 설명한 바와 같이 한국산 겨우살이 추출물 KM-110과 상기 추출물로부터 분리한 단백질성분 KM-AS, 렉틴성분 KML-C 및 두 렉틴 KML-IIU 및 KML-IIL, 단백질 KM-AS에서 렉틴성분 KML-C를 제거한 C-free-AS로 헤파린 컬럼에 통과시켜 분리한 단백질 KMHBP 및 단백질 KMHBP와 KML-C의 혼합물인 KM은 체액성 및 세포성 면역체계를 자극하는 면역증강 효과가 있으며, 동물에 대한 임상 실험결과 종양세포에 대해 직간접적으로 대응하는 대식세포 및 자연살해세포의 활성을 높혀 항종양효과를 나타내는 뛰어난 효과가 있으므로 생물의약 산업상 매우 유용한 발명인 것이다.

【보정대상항목】 도 8

【보정방법】 정정

【보정내용】

【도 8】

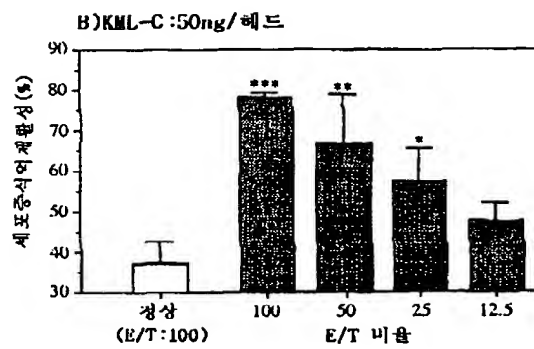
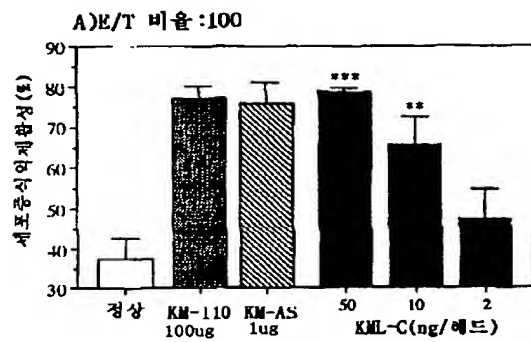


【보정대상항목】 도 12

【보정방법】 정정

【보정내용】

【도 12】



【보정대상항목】 도 15

【보정방법】 정정

【보정내용】

【도 15】

